

TESIS DOCTORAL

**Efectos citotóxicos de ftalatos:  
identificación de biomarcadores  
moleculares de ecotoxicidad en larvas  
acuáticas de *Chironomus riparius* (Diptera)**

Memoria presentada por **Óscar Herrero Felipe**  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
por la Universidad Autónoma de Madrid

**2013**



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido llevado a cabo en el Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, dentro del Departamento de Física Matemática y de Fluidos de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), bajo la dirección de la Dra. **Rosario Planelló Carro** y la Dra. **Gloria Morcillo Ortega**, con la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto CTM2009-07189.





# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el fruto de una larga travesía que por fin llega a buen puerto. En el trayecto he vivido diferentes experiencias y conocido distintos lugares y gente variada. No siempre han sido buenos, pero todos ellos han aportado lo necesario para que a día de hoy pueda dar por exitosamente cerrada esta etapa.

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a la Dra. M<sup>a</sup> del Rosario Planelló y a la Dra. Gloria Morcillo, directoras de este trabajo y con cuya orientación y ayuda ha sido posible su realización. Especialmente agradezco a Charo su total implicación, constante participación y apoyo incondicional, actitudes que me han permitido disfrutar de ella como una gran compañera y una buena amiga. Sé que su tarea no ha sido fácil y que ha habido obstáculos que sortear. El fruto está aquí; esta tesis es tan mía como tuya.

Gracias a todos mis compañeros del Grupo de Biología y Toxicología Ambiental y del Grupo de Biología Evolutiva de la UNED, por su colaboración y por los buenos ratos compartidos. Iván, gracias por la fácil convivencia y por ayudarme a darle un toque personal a la pecera que tenemos por despacho. Gracias también a quienes me han ayudado dentro del Departamento de Física Matemática y de Fluidos, especialmente su director el Dr. Carlos Antoranz, que siempre ha mostrado interés por el progreso de este trabajo.

Quiero agradecer a la Dra. María José Servia y a Pablo Gómez Sande, de la Estación de Hidrobiología 'Encoro do Con', los buenos momentos vividos durante mis cortas estancias de investigación en Galicia, tanto en las jornadas de muestreo como al margen del trabajo. Gracias igualmente a todo el equipo de la Estación por el excelente trato que en todas las ocasiones me han dispensado.

No hubiera sido posible llegar a este punto sin que previamente otros me hubieran dado la oportunidad de empezar una carrera investigadora. Muchas gracias al Dr. Eduardo de la Peña, por permitirme dar los primeros pasos en este mundillo dentro de su laboratorio del CSIC, así como a Antonia Martínez, que en aquella etapa me ayudó con diligencia siempre que estuvo de su mano. También quiero agradecer la oportunidad que la Dra. M<sup>a</sup> José Hazen me brindó al acogerme en su laboratorio A-I 10 de la Universidad Autónoma de Madrid para emprender mi etapa predoctoral, durante unos años que considero laboralmente muy productivos y que a fecha de hoy siguen siéndolo a nivel personal.

De aquella época en la UAM me llevé y conservo lo mejor que pude encontrar: la fiel amistad de Paloma, Jose y Vero. Desde entonces hemos compartido alegrías y penas de todos los colores. Y me siento profundamente agradecido de poder seguir compartiéndolas en el futuro. A ti Paloma, te agradezco especialmente todos los momentos vividos y que durante este tiempo hayas sido siempre un ejemplo a seguir, como persona y como profesional.

Quiero también aprovechar la ocasión para dar las gracias a mis amigos de toda la vida, especialmente a Emilio y a Germán, por haber estado disponibles siempre que han sido necesarios y por su paciencia ante los muchos planes rechazados por mi parte en pro de este trabajo. Y gracias también a ti, Edu, mi querido compañero de carrera y piso, por los buenísimos recuerdos que mantengo de los muchos ratos vividos juntos, por tus buenos consejos y, en definitiva, por tenerte siempre ahí a pesar de la distancia.

No me olvido tampoco de mi madre y de mi padre, ni de mi hermana Laura, ni de mis sobrinos Emma y Gael, ni de mi familia política, ni del resto de familiares cercanos. Su confianza en mí y su cariño han sido una fuente de energía inagotable todo este tiempo.

Gracias a Greta, mi perra, por obligarme a desconectar del mundanal ruido al menos tres veces por día. Algunas de esas pausas han resultado productivas en lo profesional y todas ellas han sido positivas en lo cardiovascular.

Y aunque en esta ocasión te deje para el final, sabes que siempre eres la primera en todo. Muchas gracias a ti, Ana, por serlo todo en mi vida y por dejarme representarlo todo en la tuya. No habría sido posible alcanzar la meta de no haberte tenido a mi lado. Te agradezco los ánimos infinitos, las buenas ideas, tu constante interés y, sobre todo, las muchísimas cosas que no tienen absolutamente nada que ver con el trabajo... la luz y el color de mis días.

Gracias a todos,

Óscar





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	I
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>1. FTALATOS</b>	9
1.1. FTALATOS Y DISRUPCIÓN ENDOCRINA	10
1.2. DI (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)	14
1.3. BUTIL BENCIL FTALATO (BBP)	19
<b>2. LA EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS</b>	23
2.1. <i>Chironomus</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	26
<b>3. APROXIMACIÓN AL DISEÑO EXPERIMENTAL:</b>	
<b>SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTUDIO</b>	27
3.1. EXPRESIÓN GÉNICA EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS: ANILLOS DE BALBIANI	28
3.2. NUCLÉOLO Y BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS	30
3.3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y RESPUESTA CELULAR DE ESTRÉS	32
3.4. RUTA HORMONAL	35
3.5. MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN	37
3.6. METABOLISMO ENERGÉTICO	42
3.7. COMPORTAMIENTO DE POBLACIONES NATURALES: ESTUDIOS DE CAMPO	44
<b>OBJETIVOS</b>	47
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	51
<b>1. ORGANISMO DE ENSAYO</b>	53
1.1. CULTIVOS DE LABORATORIO	53
1.2. POBLACIONES NATURALES	54
<b>2. COMPUESTOS QUÍMICOS</b>	58
<b>3. REACTIVOS Y ENZIMAS</b>	58
<b>4. OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	59
<b>5. SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ESTUDIO</b>	61

# ÍNDICE

<b>6. ESTUDIOS DE TOXICIDAD</b>	62
6.1. TOXICIDAD AGUDA	63
6.2. TOXICIDAD RETARDADA	64
<b>7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA</b>	64
7.1. EXTRACCIÓN DE ARN	64
7.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA	65
7.3. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR	66
7.4. ANÁLISIS MEDIANTE REAL TIME PCR	68
<b>8. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b>	69
8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	69
8.2. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	70
<b>9. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS</b>	70
9.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DEL GEL DE AGAROSA	70
9.2. LIGACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y SIEMBRA	71
9.3. SELECCIÓN DE COLONIAS Y SECUENCIACIÓN DE BACTERIAS POSITIVAS	71
<b>10. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	72
10.1. ESTUDIOS DE INMUNOCITOQUÍMICA	72
10.2. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	73
10.3. TRATAMIENTO DE LAS IMÁGENES	74
<b>11. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS</b>	74
<b>12. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS</b>	74
<b>RESULTADOS</b>	77
<b>1. DIANAS DE TOXICIDAD</b>	79
1.1. SELECCIÓN DE LAS RUTAS CELULARES Y GENES DE ESTUDIO	79
Biogénesis de ribosomas	80
Respuesta celular de estrés	81

# ÍNDICE

Ruta endocrina .....	82
Metabolismo celular: obtención de energía y detoxificación .....	83
<b>1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES <i>hsp10</i> y <i>rpL4</i> en <i>Chironomus riparius</i> .....</b>	<b>84</b>
1.2.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A LOS GENES <i>hsp10</i> y <i>rpL4</i> .....	84
<i>hsp10</i> .....	84
<i>rpL4</i> .....	88
1.2.2. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS GÉNICOS OBTENIDOS .....	90
<b>2. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LABORATORIO .....</b>	<b>91</b>
2.1. DEHP .....	91
2.1.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA .....	91
2.1.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES .....	92
2.1.2.1. ESTUDIOS A 24H .....	92
2.1.2.2. ESTUDIOS A TIEMPOS LARGOS .....	94
Efectos sobre la biogénesis ribosómica .....	95
Efectos sobre la respuesta celular de estrés .....	96
Efectos sobre la ruta hormonal .....	98
Efectos sobre el metabolismo energético .....	99
Efectos sobre el metabolismo de detoxificación .....	100
2.1.2.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL DEHP .....	103
2.2. BBP .....	104
2.2.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA .....	104
2.2.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES .....	105
2.2.2.1. ESTUDIOS A 24H .....	105
2.2.2.2. ESTUDIOS A TIEMPOS LARGOS .....	109
Efectos sobre la biogénesis ribosómica .....	109
Efectos sobre la respuesta celular de estrés .....	111

# ÍNDICE

Efectos sobre la ruta hormonal .....	113
Efectos sobre el metabolismo energético .....	114
Efectos sobre el metabolismo de detoxificación .....	114
2.2.2.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL BBP .....	117
2.2.3. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE LA GLÁNDULA SALIVAL .....	118
2.2.3.1. LOS ANILLOS DE BALBIANI Y EL NUCLEOLO .....	120
2.2.3.2. RESUMEN DE LOS EFECTOS CITOLÓGICOS DEL BBP .....	123
<b>3. ESTUDIOS EN POBLACIONES NATURALES .....</b>	<b>124</b>
3.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA .....	124
3.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES .....	125
3.2.1. DEHP .....	125
3.2.2. BBP .....	128
3.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS EN POBLACIONES NATURALES .....	131
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>183</b>
ANEXO I: Análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras de agua y sedimento del río Sar .....	185
ANEXO II: Publicaciones científicas .....	191



---

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Resumen de la información relevante sobre el DEHP que debe aparecer en las fichas de datos de seguridad (FDS), según el Reglamento (CE) n° 1272/2008 y la Directiva 2001/59/CE .....	14
TABLA 2. Principales características físico-químicas del DEHP (ATSDR, 2002) .....	15
TABLA 3. Concentraciones máximas medias detectadas de DEHP (Clark y col., 2003) .....	16
TABLA 4. Resumen de la información relevante sobre el BBP que debe aparecer en las fichas de datos de seguridad (FDS), según el Reglamento (CE) n° 1272/2008 y la Directiva 2004/73/CE .....	20
TABLA 5. Principales características físico-químicas del BBP (NTP-CERHR, 2003) .....	21
TABLA 6. Concentraciones máximas medias detectadas de BBP (Clark y col., 2003) .....	22
TABLA 7. Principales funciones celulares en las que participan las proteínas de choque térmico estudiadas en este trabajo .....	33
TABLA 8. Principales reactivos y enzimas empleados en este trabajo .....	59
TABLA 9. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en este trabajo .....	60
TABLA 10. Programas de PCR empleados en la amplificación de los distintos genes analizados en este trabajo .....	66
TABLA 11. Eficiencias de los genes empleados en los estudios con RealTime PCR .....	68
TABLA 12. Números de acceso y longitud de las secuencias parciales de aminoácidos (aa) y nucleótidos (pb) homólogas de la proteína HSP10 de <i>C. tentans</i> , en las distintas especies utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos para amplificar este gen en <i>C. riparius</i> .....	87
TABLA 13. Números de acceso y longitud de las secuencias homólogas de aminoácidos de las proteínas RPL4 y RPL1 en las distintas especies utilizadas en el estudio filogenético .....	88
TABLA 14. Tamaño de los fragmentos amplificados y porcentajes máximos de identidad de proteína encontrados en artrópodos para los dos genes seleccionados en el estudio con <i>C. riparius</i> .....	90
TABLA 15. Secuencias de los dos nuevos fragmentos génicos identificados en <i>C. riparius</i> .....	90

---

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 16. Análisis cuantitativo de distintos compuestos presentes en las muestras de agua y sedimento del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo .....	187
TABLA 17. Análisis cualitativo de plaguicidas en las muestras de agua ( $\text{ng l}^{-1}$ ) y sedimento ( $\text{ng g}^{-1}$ ) del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo .....	188
TABLA 18. Análisis cualitativo de distintos compuestos en las muestras de agua ( $\text{ng l}^{-1}$ ) y sedimento ( $\text{ng g}^{-1}$ ) del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo .....	189

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Ejemplos de materiales plásticos en cuyo proceso de fabricación se emplean ftalatos .....	10
FIGURA 2. Distintos estados en el desarrollo de <i>Chironomus riparius</i> .....	26
FIGURA 3. Cromosomas politénicos (I, II, III y IV) de las glándulas salivales de <i>Chironomus</i> sp., con su característico patrón de bandas .....	29
FIGURA 4. Representaciones esquemáticas del cromosoma IV de <i>C. riparius</i> .....	30
FIGURA 5. Esquema general de la producción de ecdisona y su papel en el desarrollo de insectos .....	36
FIGURA 6. Esquema de las Fases I, II y III del metabolismo de detoxificación de xenobióticos .....	39
FIGURA 7. Algunas de las funciones más relevantes de la enzima GAPDH .....	43
FIGURA 8. Localización geográfica de la zona de muestreo de las larvas de <i>C. riparius</i> que dieron origen a los cultivos de laboratorio con los que se ha llevado a cabo la experimentación en este trabajo .....	54
FIGURA 9. Localización geográfica de la zona de muestreo de las larvas de <i>C. riparius</i> empleadas en la experimentación de campo llevada a cabo en este trabajo .....	55
FIGURA 10. Distintos momentos en el desarrollo de los trabajos de campo .....	56
FIGURA 11. Protocolo experimental seguido en los estudios de toxicidad .....	63
FIGURA 12. Preparación de las muestras para su amplificación por PCR .....	67
FIGURA 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína HSP10 en <i>C. tentans</i> .....	85
FIGURA 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos homólogas a la que codifica para la proteína HSP10 en <i>C. tentans</i> .....	85
FIGURA 15. Árbol filogenético construido en base a los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RPL1 y RPL4 en las distintas especies analizadas .....	89

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 16. Análisis de la supervivencia de larvas de <i>C. riparius</i> tras exposiciones a dosis crecientes de DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	92
FIGURA 17. Análisis de la expresión génica de larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24 horas. Efectos sobre la síntesis de ARN prerribosómico ( <i>ITS2</i> ), la respuesta celular a estrés ( <i>hsc70</i> , <i>hsp70</i> , <i>hsp40</i> ), el metabolismo celular ( <i>GAPDH</i> ) y la ruta hormonal de la ecdisona ( <i>EcR</i> ) .....	93
FIGURA 18. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los ribosomas ( <i>rpL4</i> , <i>rpL13</i> ) en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y/o 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	95
FIGURA 19. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés ( <i>hsc70</i> , <i>hsp70</i> , <i>hsp40</i> , <i>hsp27</i> ) en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y/o 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	97
FIGURA 20. Análisis de la expresión del gen <i>EcR</i> , relacionado con la ruta hormonal de la ecdisona, en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	99
FIGURA 21. Análisis de la expresión del gen <i>GAPDH</i> , relacionado con el metabolismo celular, en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	100
FIGURA 22. Análisis de la expresión de <i>CYP450</i> , gen relacionado con el metabolismo de detoxificación, en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	101
FIGURA 23. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	102

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 24. Análisis de la supervivencia de larvas de <i>C. riparius</i> tras exposiciones a dosis crecientes de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	104
FIGURA 25. Análisis de la expresión génica de larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 horas. Efectos sobre la biogénesis de los ribosomas ( <i>ITS2</i> , <i>rpL4</i> , <i>rpL13</i> ), la respuesta celular a estrés ( <i>hsc70</i> , <i>hsp70</i> , <i>hsp40</i> , <i>hsp27</i> , <i>hsp10</i> ), la ruta hormonal de la ecdisona ( <i>EcR</i> , <i>ERR</i> ) y el metabolismo celular ( <i>GAPDH</i> , <i>CYP450</i> ) .....	107
FIGURA 26. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los ribosomas ( <i>ITS2</i> , <i>rpL4</i> , <i>rpL11</i> , <i>rpL13</i> ) en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	110
FIGURA 27. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés ( <i>hsc70</i> , <i>hsp70</i> , <i>hsp40</i> , <i>hsp27</i> , <i>hsp10</i> ) en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	111
FIGURA 28. Análisis de la expresión de genes relacionados con la ruta hormonal de la ecdisona ( <i>EcR</i> , <i>ERR</i> ) en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	113
FIGURA 29. Análisis de la expresión de <i>GAPDH</i> , gen relacionado con el metabolismo energético, en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	114
FIGURA 30. Análisis de la expresión de <i>CYP450</i> y <i>Gpx</i> , genes relacionados con el metabolismo de detoxificación, en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	115
FIGURA 31. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 32. Imágenes representativas del patrón de expresión génica en cromosomas politénicos de larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ BBP durante 24 y 48 horas .....	119
FIGURA 33. Detección <i>in situ</i> de secuencias híbridas de ADN/ARN en el cromosoma IV de larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ BBP durante 24 y 48 horas .....	121
FIGURA 34. Efecto sobre el patrón de condensación del nucléolo y de los <i>puffs</i> BR1 y BR2 en larvas de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ BBP durante 24 y 48 horas .....	122
FIGURA 35. Análisis de la supervivencia de larvas de poblaciones naturales <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de DEHP y BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	125
FIGURA 36. Análisis de la expresión génica en larvas de poblaciones naturales de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	126
FIGURA 37. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en poblaciones naturales de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	127
FIGURA 38. Análisis de la expresión génica en larvas de poblaciones naturales de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	129
FIGURA 39. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en poblaciones naturales de <i>C. riparius</i> expuestas a $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h) .....	130

---

# ABREVIATURAS

<b>20E:</b> <i>20-Hydroxyecdysone</i>	<b>DEPC:</b> <i>Diethylpyrocarbonate</i>
<b>AChE:</b> <i>Acetylcholinesterase</i>	<b>DIBP:</b> <i>Diisobutyl phthalate</i>
<b>ADN:</b> <i>Ácido desoxirribonucleico</i>	<b>DIN:</b> <i>Deutsches Institut für Normung</i>
<b>ADNc:</b> <i>ADN complementario</i>	<b>DIDP:</b> <i>Diisodecyl phthalate</i>
<b>AIF:</b> <i>Apoptosis-inducing factor</i>	<b>DINP:</b> <i>Diisononyl phthalate</i>
<b>AMPc:</b> <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>	<b>DnBP:</b> <i>Di-n-butyl phthalate</i>
<b>ANOVA:</b> <i>Analysis of variance</i>	<b>dNTPs:</b> <i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i>
<b>ARN:</b> <i>Ácido ribonucleico</i>	<b>DOP:</b> <i>Diocetyl phthalate</i>
<b>ARNm:</b> <i>ARN mensajero</i>	<b>DTT:</b> <i>Dithiothreitol</i>
<b>ARNr:</b> <i>ARN ribosómico</i>	<b>EC:</b> <i>European Commission</i>
<b>ASTM:</b> <i>American Society for Testing and Materials</i>	<b>EcR:</b> <i>Ecdysone Receptor</i>
<b>ATSDR:</b> <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>	<b>ECx:</b> <i>Effective Concentration</i>
<b>BBP:</b> <i>Benzyl butyl phthalate</i>	<b>ECB:</b> <i>European Chemicals Bureau</i>
<b>BCA:</b> <i>Bicinchoninic acid</i>	<b>ECHA:</b> <i>European Chemicals Agency</i>
<b>BR:</b> <i>Balbani Ring</i>	<b>EDC:</b> <i>Endocrine Disrupting Chemical</i>
<b>CAS:</b> <i>Chemical Abstracts Service</i>	<b>EDTA:</b> <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>CAT:</b> <i>Catalase</i>	<b>EEC:</b> <i>European Economic Community</i>
<b>CD:</b> <i>Compact Disc</i>	<b>EHEC:</b> <i>Estación de Hidrobiología 'Encoro do Con'</i>
<b>CERHR:</b> <i>Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction</i>	<b>EPA:</b> <i>Environmental Protection Agency</i>
<b>Cit C:</b> <i>Citocromo C</i>	<b>EPOC:</b> <i>Environment Policy Committee</i>
<b>CMR:</b> <i>Carcinogenic, Mutagenic or toxic for Reproduction</i>	<b>ER:</b> <i>Estrogen receptor</i>
<b>CPSC:</b> <i>Consumer Product Safety Commission</i>	<b>ERA:</b> <i>Environmental Risk Assessment</i>
<b>CSIC:</b> <i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas</i>	<b>ERR:</b> <i>Estrogen-Related Receptor</i>
<b>CYP450:</b> <i>Cytochrome P450</i>	<b>EtOH:</b> <i>Ethanol</i>
<b>DALYs:</b> <i>Disability-Adjusted Life Years</i>	<b>FDA:</b> <i>Food and Drug Administration</i>
<b>DBP:</b> <i>Dibutyl phthalate</i>	<b>FITC:</b> <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>DEHP:</b> <i>Bis(2-ethylhexyl) phthalate</i>	<b>GAPDH:</b> <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>DEP:</b> <i>Diethyl phthalate</i>	<b>GC-MS:</b> <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>
	<b>GPx:</b> <i>Glutathione peroxidase</i>

## ABREVIATURAS

**GR:** *Glucocorticoid receptor*

**GST:** *Glutathione S-transferase*

**GMPc:** *Cyclic guanosine monophosphate*

**HPLC/MS:** *High Performance Liquid Chromatography/  
Mass Spectrometry*

**HSP:** *Heat Shock Protein*

**IARC:** *International Agency for Research on Cancer*

**IP<sub>3</sub>R:** *Inositol trisphosphate receptor*

**IPCS:** *International Programme on Chemical Safety*

**ISO:** *International Organization for Standardization*

**ITS:** *Internal transcribed spacer*

**JH:** *Juvenile Hormone*

**LOEC:** *Lowest Observed Effect Concentration*

**M:** *Media*

**MC:** *Medio de cultivo*

**MoA:** *Mode of Action*

**MRP:** *Multidrug Resistance Protein*

**NADH:** *Nicotinamide adenine dinucleotide*

**NICNAS:** *National Industrial Chemicals Notification  
and Assessment Scheme*

**NIH:** *U.S. National Institutes of Health*

**NOEC:** *No Observed Effect Concentration*

**NTP:** *National Toxicology Program*

**OECD:** *Organisation for Economic Co-operation and  
Development*

**OMS:** *Organización Mundial de la Salud*

**PBS:** *Phosphate buffered saline*

**PCR:** *Polymerase chain reaction*

**PEC:** *Predicted Environmental Concentration*

**PML:** *Promyelocytic leukemia*

**PNEC:** *Predicted No Effect Concentration*

**PNUMA:** *Programa de las Naciones Unidas para el  
Medio Ambiente*

**PPAR:** *Peroxisome proliferator-activated receptor*

**PPCPs:** *Pharmaceuticals and Personal Care Products*

**PR:** *Progesterone receptor*

**PTTH:** *Prothoracicotropic Hormone*

**PVC:** *Polyvinyl chloride*

**REACH:** *Registration, Evaluation, Authorisation and  
Restriction of Chemicals*

**RER:** *Retículo endoplásmico rugoso*

**RPLx:** *Ribosomal protein Lx*

**RT-PCR:** *Reverse transcription PCR*

**RXR:** *Retinoid X Receptor*

**SE:** *Error estándar*

**SOD:** *Superoxide dismutase*

**TBT:** *Tributyltin*

**TEMED:** *Tetramethylethylenediamine*

**TRITC:** *Tetramethylrhodamine isothiocyanate*

**UAM:** *Universidad Autónoma de Madrid*

**UE:** *Unión Europea*

**UNED:** *Universidad Nacional de Educación a Distancia*

**UNEP:** *United Nations Environment Programme*

**UPGMA:** *Unweighted Pair Group Method with  
Arithmetic Mean*

**USP:** *Ultraspiracle*

**VDAC:** *Voltage-dependent anion channel*

**WHO:** *World Health Organization*



# RESUMEN



Los ftalatos son compuestos plastificantes de amplio uso industrial y presencia ubicua en el medio ambiente. El di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butil bencil ftalato (BBP) son dos de los cinco ftalatos que hasta la fecha han sido evaluados por la Agencia Europea de Sustancias Químicas, estando ambos incluidos en su lista de sustancias candidatas que suscitan especial preocupación por su capacidad disruptora endocrina. Su constante presencia en ambientes acuáticos resulta especialmente preocupante debido a su capacidad de acumularse en los sedimentos y a lo largo de las cadenas tróficas. Aunque sus efectos tóxicos para la reproducción y el desarrollo han sido descritos en vertebrados, la información sobre los efectos que provocan en invertebrados es todavía limitada.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los efectos citotóxicos del DEHP y el BBP en larvas de cultivos de laboratorio y de poblaciones naturales de *Chironomus riparius*, organismo de referencia en Toxicología acuática. El análisis de los efectos citotóxicos, evidenciados por las alteraciones en diferentes procesos celulares, ha permitido identificar biomarcadores moleculares de exposición a estos compuestos y aumentar así la información disponible en la actualidad sobre los mecanismos de acción de los mismos.

El estudio de los efectos de estos ftalatos se llevó a cabo en tratamientos agudos en exposiciones cortas (24h), prolongadas (hasta 96h) y retardadas (24h de tratamiento y 24h de recuperación sin droga), mediante el análisis de cambios en la expresión de genes y en los niveles de actividad enzimática de dianas relacionadas con importantes procesos fisiológicos: biogénesis ribosómica (*ITS2*, *rpl4*, *rpl11* y *rpl13*), sistema endocrino (*EcR*, *ERR*), respuesta celular de estrés (*hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp27* y *hsp10*), metabolismo energético (*GAPDH*) y metabolismo de xenobióticos (*CYP450*, *GST* y *GPx*).

Los resultados tras 24 horas de exposición a las dosis más altas de estos compuestos mostraron que tanto el BBP como el DEHP inducen la expresión del gen *hsp70*, lo que refuerza la idea de que éste constituye un buen biomarcador de estrés en invertebrados en multitud de situaciones ambientales adversas. Además, el BBP aumenta de forma significativa los niveles de transcrito del gen del receptor de la ecdisona (*EcR*), resultado que muestra por vez primera la capacidad del BBP de alterar de forma selectiva un gen que representa un elemento clave en la ruta de señalización celular mediada por ecdisona, sugiriendo así una interacción directa con el sistema endocrino de los insectos. En contraposición, el DEHP también provoca una alteración en la actividad del gen *EcR*, aunque consistente en este caso en una represión. Este trabajo añade un nuevo dato que refuerza la idea del gen *EcR* como un biomarcador de disrupción endocrina valioso. Por último, el BBP provocó una reducción significativa de los niveles de ARNr y de diversos genes codificantes para proteínas ribosómicas, resultado que proporciona la primera evidencia de la interacción del BBP con la biogénesis ribosómica y la alteración

de la actividad del nucléolo, un orgánulo esencial para la supervivencia de las células. Sin embargo, el DEHP no altera significativamente ninguno de los elementos de la función nucleolar analizados.

Respecto a los estudios a tiempos largos de exposición, se observó un descenso en los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados, lo que podría ser en parte consecuencia de un efecto tóxico más general de los ftalatos. Sin embargo, hay un efecto genómico diferencial del DEHP y del BBP sobre genes específicos.

Los resultados más llamativos fueron los relacionados los estudios sobre la toxicidad retardada de estos compuestos, en los que se constató el aumento generalizado de los niveles de expresión génica, especialmente de los genes relacionados con la respuesta celular a estrés. Esta respuesta sólo se vio alterada en el caso de la ruta hormonal, donde el DEHP inhibió la expresión del gen *EcR* y se comportó de forma antagónica al BBP. Este estudio aporta resultados novedosos sobre los efectos diferenciales del DEHP y el BBP en *C. riparius* y ponen de manifiesto la importancia de este organismo en la evaluación del riesgo ecotoxicológico, especialmente en ecosistemas acuáticos.

A pesar de que los biomarcadores constituyen una herramienta importante en los ensayos de laboratorio, permitiendo vincular la exposición o el efecto de sustancias tóxicas con eventos clave celulares y moleculares, resulta necesaria su validación posterior en poblaciones naturales expuestas a una mezcla compleja de contaminantes antes de poder sacar conclusiones acerca de su utilidad en escenarios reales. En este trabajo se han analizado por primera vez los efectos tóxicos de ambos ftalatos en poblaciones naturales de larvas de *Chironomus riparius*, procedentes de un río contaminado de Galicia (Sar), las cuales se encuentran expuestas de manera habitual a multitud de contaminantes, teniendo de este modo sus sistemas metabólicos adaptados a las condiciones físico-químicas del nicho ecológico que habitan.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos que los ftalatos provocan en larvas de campo muestran diferencias importantes respecto a los datos obtenidos en larvas de laboratorio en cuanto al grado de toxicidad de ambos compuestos y en el efecto que provocan sobre algunas dianas, lo que confirma la necesidad de llevar a cabo este tipo de estudios para tener una aproximación más completa sobre las dianas de efecto que cada compuesto es capaz de alterar, así como al tipo de respuesta que pueden provocar en escenarios reales.



# INTRODUCCIÓN



En el mundo en que vivimos el ser humano es sólo un accidente, pero de tal magnitud que condiciona los procesos biogeológicos de una forma drástica y hasta ahora inexorable. Su capacidad de interactuar con los ciclos que mantienen la homeostasis del planeta ha condicionado desde la antigüedad la salud del medio ambiente, pero ha sido durante las últimas décadas cuando ésta se ha visto gravemente dañada debido a la presencia de sustancias y preparados químicos de origen antropogénico.

Dado que los productos químicos se encuentran en prácticamente todo aquello que usamos y nos rodea, por motivos económicos los intereses propios de la industria química han estado tradicionalmente por encima de aquellos que concernían a la salud medioambiental y, directa o indirectamente, a la humana. Por ello, las políticas medioambientales mundiales se han encaminado en los últimos tiempos a ejercer un mayor control sobre las sustancias y preparados químicos, tanto sobre los ya existentes y comercializados como sobre aquellos de nueva producción.

El deterioro ambiental que entre todos ellos provocan es quizás más preocupante en el agua, líquido indispensable para la vida y componente fundamental de gran cantidad de actividades productivas del ser humano. En muchas localizaciones geográficas el agua se ha convertido en un recurso escaso. Su contaminación por el vertido de sustancias a causa de la actividad humana modifica la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, constituyendo un serio problema en la actualidad. Entre la amplia variedad de sustancias contaminantes se encuentran los productos orgánicos sintéticos, que tienen su origen en la industria y la agricultura, los elementos radiactivos, el petróleo y sus derivados, los metales pesados y los desechos sólidos, entre otros.

El abordaje científico de este grave problema ambiental debe combinar el desarrollo de métodos sensibles de análisis químico, eficaces, sencillos y que garanticen la detección rápida de nuevas sustancias tóxicas, con el estudio de sus posibles efectos biológicos en los organismos. La dificultad del enfoque biológico es inherente a la propia complejidad de los sistemas vivos y a su diversidad, por lo que para minimizar los errores debidos a estos factores se utilizan organismos seleccionados por su interés ecológico o por sus características idóneas como bioindicadores, analizando las respuestas de diversos parámetros que son considerados biomarcadores. En este sentido, se entiende por biomarcador todo indicador interno mensurable en un organismo, a nivel molecular o celular, que puede facilitar el entendimiento de un problema de salud medioambiental y mejorar los procesos de evaluación del riesgo. Un biomarcador válido, además, podría considerarse una pieza clave que enlaza una exposición ambiental específica con un efecto concreto sobre la salud (*National Research Council, 1987*).

En los ecosistemas acuáticos los contaminantes se integran en un complejo ciclo en el que están implicados las aguas, los sedimentos y los organismos, pudiendo tener un efecto tóxico directo y bioacumularse a través de las cadenas tróficas. Muchos de los contaminantes persistentes, bioacumulables y tóxicos se asocian fuertemente con los sedimentos a causa de sus características físico-químicas. En especial, la parte constituida por limo y arcilla es transmisora primaria de productos químicos adsorbidos, como fósforo, plaguicidas clorados o la mayor parte de los metales. Los productos químicos orgánicos ingresan frecuentemente en la cadena alimentaria a través de los organismos bentónicos, que habitan en el fondo y que constituyen el alimento para organismos superiores. En último término, se acumulan en predadores, entre los que se incluye el hombre, evidenciándose así la importancia de analizar el efecto de su toxicidad para organismos de las escalas inferiores de las redes tróficas.

De manera general, son tres los tipos de organismos empleados en estudios de ecotoxicidad acuática, pertenecientes a su vez a tres importantes grupos taxonómicos: algas, invertebrados acuáticos y peces. Las algas son importantes productores primarios y juegan un papel crucial en el mantenimiento de los ecosistemas. La diversidad de especies y la densidad poblacional de cada una de ellas son parámetros que pueden reflejar la calidad del agua. Son numerosas las directrices legales que establecen su uso como organismos de ensayo en las evaluaciones de toxicidad acuática (DIN, 1991; ISO, 2004; OECD, 2011b). Dentro de los invertebrados, especies como *Hyalella azteca* (Crustacea, Amphipoda), *Lumbriculus variegatus* (Annelida, Oligochaeta), *Chironomus tentans* y *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera), son organismos asociados a sedimentos que han adquirido progresivamente una creciente importancia en los ensayos de toxicidad (EPA, 2000; OECD, 2004a,b, 2007, 2010, 2011b). Entre las principales razones para su empleo se encuentran su corto ciclo de vida, que permite minimizar el tiempo necesario para la obtención de resultados, y los menores requerimientos de espacio y/o equipamiento en comparación con los cultivos celulares o el uso de vertebrados. Por último, dentro de los vertebrados, los peces son modelos clásicos en las evaluaciones de toxicidad acuática y durante años se han utilizado para este fin distintos parámetros como la tasa de letalidad, el crecimiento, la reproducción, el metabolismo o la fecundidad (OECD, 1992; ISO, 1996a,b). Recientemente, además, han adquirido un notable protagonismo en los estudios sobre disrupción endocrina (Scholz y Mayer, 2008; Ankley y col., 2009; Scholz y col., 2013).

La Asociación Química Americana, a través de su sección *Chemical Abstracts Service* (CAS), la mayor fuente de información sobre sustancias químicas del mundo, registra en la actualidad más de 70 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas. El registro se actualiza diariamente y en los últimos dos años ha aumentado en cerca de 10 millones de



sustancias, lo que proporciona una clara idea de la dificultad de conocer con exactitud las implicaciones para la salud y el medio ambiente que la exposición a tan elevadísima cantidad de sustancias puede conllevar.

Por poner un ejemplo, de los 5.7 millones de toneladas métricas de contaminantes que en el año 2006 se liberaron al medio ambiente o se eliminaron como residuos en Norteamérica, 1.8 millones se correspondieron con sustancias consideradas persistentes, bioacumulables o tóxicas, 970000 con sustancias carcinógenas o que se sospechaba que podían serlo y 857000 con sustancias que estaban consideradas como tóxicas para la reproducción o el desarrollo (UNEP, 2012). Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en 2011 de que en el mundo 4.9 millones de muertes (8.3% del total) y 86 millones de años de vida perdidos (DALYs, del inglés *Disability-Adjusted Life Years*) (5.7% del total) eran atribuibles a la exposición medioambiental y la gestión de sustancias químicas (UNEP, 2012).

En Europa, la entrada en vigor el 1 de junio de 2007 del Reglamento REACH, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (Reglamento (CE) n° 1907/2006), viene proporcionando un mayor control sobre aproximadamente 30000 sustancias de las 100106 que hasta esa fecha podían ser usadas sin conocer en profundidad sus propiedades, quedando a pesar de ello mucho camino por recorrer en materia de seguridad química.

## I. FTALATOS

Dentro de este mar de sustancias, el grupo de los ftalatos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a su elevada producción, su carácter ubicuo y las diversas propiedades tóxicas de varios de sus miembros. Son compuestos oleosos, incoloros, inodoros y con usos muy variados (ver Figura 1), con aplicaciones en la industria, en medicina y en productos de consumo. Se emplean como plastificantes (más del 90% de los ftalatos producidos en la Unión Europea se destina a la fabricación de PVC), en dispositivos de uso médico (tubos y bolsas de sangre), cosméticos, envases alimentarios, calzado, cables eléctricos, embalajes, artículos de papelería, juguetes, CDs, pavimentos, etc. (Staples y col., 1997; Horn y col., 2004; Oehlmann y col., 2009; Andrady y Neal, 2009). En este grupo de sustancias encontramos, entre otros, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), el butil bencil ftalato (BBP), el dietil ftalato (DEP), el dibutil ftalato (DBP), el diisobutil ftalato (DIBP), el diisononil ftalato (DINP), el diisodecil ftalato (DIDP), el di-n-butil ftalato (DnBP) y el di-n-octil ftalato (DOP).

En la Unión Europea, el di(2-etilhexil) ftalato y el butil bencil ftalato son dos de los cinco ftalatos que fueron evaluados por la antigua Oficina Europea de Sustancias Químicas (ECB, del inglés *European Chemicals Bureau*), cuyas funciones se asumen en la actualidad por la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA, del inglés *European Chemicals Agency*). Además, ambos están incluidos por esta Agencia en la lista sobre sustancias candidatas que suscitan especial preocupación (ECHA, 2008a), por sus efectos tóxicos para la reproducción. Quedan asimismo recogidos como sustancias CMR (carcinógenas, mutágenas o tóxicas para la reproducción) en el Reglamento REACH, motivo por el cual han dejado de emplearse tanto en juguetes y artículos para el cuidado de los niños como en cosméticos.



FIGURA 1. Ejemplos de materiales plásticos en cuyo proceso de fabricación se emplean ftalatos.

Generalmente, estos compuestos son rápidamente absorbidos y eliminados tras una exposición oral. El diéster se metaboliza rápidamente a monoéster mediante hidrólisis en el tracto digestivo (Albro y Thomas, 1973), siendo esta última especie química responsable también de la acción tóxica (Albro y col., 1982; Schmid y Schlatter, 1985; CPSC, 2010). Los ftalatos de bajo peso molecular y sus metabolitos son excretados en la orina, mientras que los de medio y alto peso molecular son excretados también en las heces.

## I.1. FTALATOS Y DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Cabe destacar que muchos de estos compuestos actúan sobre los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo alfa (PPAR $\alpha$ ), que regulan la expresión de diversos genes con un importante papel metabólico (Berger y Moller, 2002), como los relacionados con el metabolismo de hormonas esteroideas (Fan y col., 2004). Este receptor nuclear induce respuestas pleiotrópicas en roedores, entre las cuales se encuentran el aumento del metabolismo lipídico, de la proliferación hepatocelular y el descenso de la apoptosis hepatocelular. Juega asimismo un papel importante en los procesos de hepatocarcinogénesis, así como en otros efectos tóxicos.

Es precisamente la capacidad de este tipo de sustancias de alterar el sistema reproductor la que suscita mayor preocupación en el campo de la toxicología ambiental. Con el nombre genérico de «disruptores endocrinos» (EDCs, del inglés *Endocrine Disrupting Chemicals*) se denomina a las sustancias químicas exógenas que alteran la función del sistema endocrino y, como consecuencia, causan efectos adversos para la salud en un organismo intacto, su progenie, o en (sub)poblaciones. Estos compuestos pueden ejercer sus efectos mediante distintos mecanismos:

- Pueden mimetizar la actividad biológica de una hormona endógena, uniéndose a un receptor celular (efecto agonista).
- Pueden unirse a un receptor sin activarlo, impidiendo que lo hagan las hormonas naturales (efecto antagonista).
- Pueden alterar los niveles de hormonas presentes en el flujo sanguíneo, interfiriendo con las proteínas de transporte.
- Pueden interferir en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis o la lisis de las hormonas.
- Pueden modificar la actividad transcripcional de los genes relacionados con hormonas y receptores.

El número de sustancias químicas para las cuales se determina una actividad disruptora endocrina se incrementa día a día, representando una seria amenaza para la salud humana, la fauna y los ecosistemas. Entre todas ellas se pueden encontrar productos químicos sintéticos (biocidas, fitosanitarios, cosméticos, componentes de polímeros plásticos, pinturas, etc.), medicamentos sintéticos (anticonceptivos hormonales y terapia hormonal sustitutiva), productos químicos naturales (incluyendo toxinas como los fitoestrógenos) y hormonas naturales (procedentes de animales o personas y liberadas al medio ambiente, producidas por una especie y disruptoras endocrinas para otras).

Además, según el último informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud, acerca del estado de los conocimientos científicos sobre las sustancias químicas que perturban la función endocrina (*State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*), muchas sustancias químicas sintéticas cuyos efectos sobre el sistema hormonal todavía están por investigar podrían tener importantes repercusiones en la salud (WHO, 2013).

La evidencia que sugiere un vínculo entre la exposición a determinados productos químicos y la alteración de funciones endocrinas se ha puesto de manifiesto en el estudio de especies animales en distintos ecosistemas (moluscos, crustáceos,

peces, reptiles, aves y mamíferos) en diferentes partes del mundo. La dificultad de predecir sus efectos a largo plazo hace de su estudio uno de los retos más importantes para la investigación en el campo de la Toxicología ambiental. La dispersión de este tipo de sustancias en el medio ambiente es tal que puede decirse que no hay especie animal que no se haya visto expuesta a la acción de alguna o de la mezcla de varias de ellas, siendo el medio acuático especialmente sensible a este tipo de contaminación (Kang y col., 2007).

Los ecosistemas acuáticos son muy vulnerables al recibir el impacto directo de los efluentes de las depuradoras, la industria y la agricultura, los cuales incluyen ftalatos en su composición química. Los organismos que habitan este medio quedan expuestos con facilidad, bien a través de la columna de agua, bien a través del alimento o de los sedimentos, en función del nicho ecológico de cada especie (Oehlmann, 2008, 2009). Las comunidades bentónicas, en las que *Chironomus* constituye uno de los macroinvertebrados más abundantes, son sensibles a los cambios en las condiciones del agua y de los sedimentos, siendo por tanto estos organismos unos excelentes indicadores ambientales para las alteraciones y el impacto de los contaminantes en el agua.

La preocupación generada en torno a los EDCs radica en que el sistema endocrino, su principal diana, es crítico para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la diferenciación sexual y la regulación de los procesos metabólicos, de manera que su disfunción se manifiesta finalmente en anomalías en estos procesos.

La respuesta hormonal es consecuencia de la liberación, por parte de una glándula endocrina, de una hormona que circula por la sangre o la hemolinfa y que regula de manera coordinada respuestas sobre determinados tejidos diana. En las células, la vía de señalización puede ser de dos tipos:

- La transducción de señales de hormonas peptídicas solubles en agua, que no pueden atravesar la membrana celular lipídica, se realiza por mediación de receptores proteicos situados en la superficie de la célula. La unión de estos ligandos produce cambios conformacionales en los correspondientes receptores, lo que a su vez provoca la activación de moléculas capaces de actuar como segundos mensajeros en la célula diana (AMPc,  $\text{Ca}^{2+}$ , GMPc, etc.), controlando procesos bioquímicos intracelulares.
- Las hormonas liposolubles pueden atravesar sin problema la membrana celular. La respuesta de este tipo de hormonas está mediada generalmente por proteínas intracelulares. La unión del ligando a

su receptor induce un cambio alostérico que permite al complejo receptor-hormona interaccionar con cofactores y con determinadas secuencias de ADN situadas en la región promotora de algunos genes, actuando como factores de transcripción que activan o silencian dichos genes (Evans, 1988; Beato, 1991).

Las hormonas esteroideas son un grupo muy conservado de moléculas que actúan uniéndose a determinados receptores, activando subsecuentemente la transcripción de genes. Cabe destacar a este respecto que la primera visualización del efecto de una hormona en el genoma se produjo en los cromosomas politénicos gigantes de *Chironomus*, lo que dio lugar al primer modelo de regulación génica bajo la influencia de las hormonas esteroideas, hito en la historia de la endocrinología, que se descubrió con la ecdisona (Clever y Karlson, 1960).

Los receptores nucleares de hormonas representan una gran familia de factores de transcripción, caracterizados por la presencia de dedos de zinc. En este grupo se incluyen receptores de esteroides, de vitamina D3 y de ácido retinoico (Evans, 1988; Green y col., 1988; Gronemeyer, 1991, 1992). Su estructura general atiende a la existencia de dominios funcionales involucrados en procesos como la unión a ADN, la formación de dímeros, la unión a ligandos, la formación de complejos proteicos con proteínas de choque térmico y la activación transcripcional (Krust y col., 1986; Kumar y col., 1987). Como consecuencia de la existencia de módulos estructurales, cada dominio es capaz de actuar con relativa independencia (Evans, 1988).

La mayoría de los EDCs identificados hasta el momento interfieren con las hormonas esteroideas, fundamentalmente estrógenos, por lo que también se les denomina «xenoestrógenos». Algunos actúan sobre el sistema reproductor masculino, produciendo efectos que van desde la disminución del número de espermatozoides hasta el incremento de tumores testiculares tanto en humanos como en otros vertebrados terrestres y acuáticos, provocando una cierta feminización en los organismos expuestos. Aunque algunos efectos adversos pueden detectarse como cambios morfológicos, otros son más sutiles y difíciles de analizar, tales como cambios en el comportamiento, que en última instancia afectan también a la reproducción.

Por todo esto, resulta de especial importancia la detección de dianas moleculares de acción endocrina que permitan detectar los efectos de xenobióticos sobre el sistema hormonal y explicar los cambios que finalmente este tipo de compuestos puedan producir sobre la reproducción y el desarrollo de los individuos.

## I.2. DI (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)

El di (2-etilhexil) ftalato, también conocido como dioctil ftalato, es una de las 533 sustancias químicas recogidas por la Comisión Europea en la lista de sustancias candidatas para su estudio por sus propiedades en materia de disrupción endocrina (EC, 2000). Además, en 2008 se incluyó en la lista de sustancias candidatas que suscitan especial preocupación (ECHA, 2008b), compuesta en la actualidad por 144 sustancias. El Reglamento (CE) n° 1272/2008 clasifica al DEHP como tóxico para la reproducción y lo incluye en la categoría 1B (ver Tabla I). Se encuentra también clasificado de acuerdo al Anexo 1B de la Directiva 2001/59/CE, como tóxico para la reproducción, categoría 2, por sus efectos sobre la salud humana (ver Tabla I). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) lo clasificó en 1982 en el grupo 2B (posible carcinógeno en humanos), aunque años después rebajó esta clasificación y lo incluyó dentro del grupo 3, no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad a los seres humanos (IARC, 2000).

### Reglamento (CE) n° 1272/2008

Pictograma de peligro	GHS08	Peligro
Código de peligro	H360Fd	Puede perjudicar a la fertilidad. Se sospecha que daña al feto.
Consejos de prudencia	P201 P308+P313	Solicitar instrucciones especiales antes del uso. En caso de exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico.

### Directiva 2001/59/CE

Pictograma de peligrosidad	T	Tóxico
Advertencias sobre riesgos	R60-61	Puede perjudicar la fertilidad. Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.
Consejos de seguridad	S53-45	Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

TABLA I. Resumen de la información relevante sobre el DEHP que debe aparecer en las fichas de datos de seguridad (FDS), según el Reglamento (CE) n° 1272/2008 y la Directiva 2001/59/CE.

El DEHP es un líquido incoloro soluble en disolventes apolares y muy poco soluble en agua. Es el plastificante más usado en el mundo y también el más empleado en la fabricación de productos médicos (FDA, 2001; NTP-CERHR, 2006). Se trata de un éster del ácido bencenodicarboxílico que se añade comúnmente a los plásticos para hacerlos más flexibles, pudiendo llegar a constituir el 40% de los materiales de vinilo y siendo para este uso el 95% de su producción total (ATSDR, 2002; NICNAS, 2010).

Sus principales características físico-químicas se detallan a continuación:

#### Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

Número CAS	117-81-7
Fórmula Molecular	$C_{24}H_{38}O_4$
Peso Molecular	390.57 g mol <sup>-1</sup>
Punto de fusión	-47 °C
Punto de ebullición	384 °C
Presión de vapor	$1 \times 10^{-7}$ mmHg a 25 °C
Solubilidad en agua	0.041 mg l <sup>-1</sup>
Log Kow	7.5

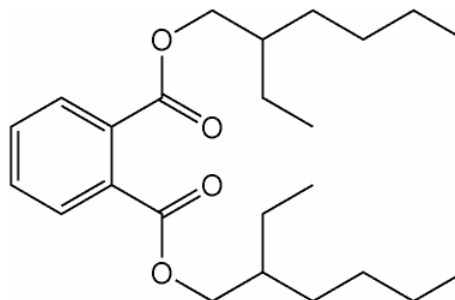


TABLA 2. Principales características físico-químicas del DEHP (ATSDR, 2002).

Por su elevado coeficiente de reparto octanol-agua cabe esperar que el DEHP disponible en el medio se adsorba fuertemente a la materia orgánica. Esto, unido a su baja solubilidad en agua, hace que tenga mayor afinidad para unirse a la fase particulada. Los valores de bioacumulación del DEHP varían en función de las especies empleadas en los estudios, fundamentalmente debido a las distintas tasas de metabolización existentes entre unas y otras (IPCS, 1992; ECB, 2008).

Los posibles escenarios de exposición humana y medioambiental a este compuesto son muy variados, debido a sus muchos usos y su carácter ubicuo. Las vías de entrada principales en humanos son la dieta (dado que el compuesto se desprende de los recipientes plásticos de almacenaje de alimentos) y los dispositivos médicos como sondas, bolsas de diálisis, catéteres, tubos, etc. (Magdouli y col., 2013). Por otro lado, su entrada en el medio ambiente se produce fundamentalmente por lixiviación en vertederos a partir de desechos plásticos o por incineración de este tipo de residuos (ECB, 2008b). La contaminación ambiental por DEHP tiene su origen en las fábricas que lo manufacturan y en los productos domésticos que lo contienen. Al no estar químicamente unido al polímero de PVC, puede liberarse al medio desde los materiales plásticos en uso (Ito y col., 2005; Koch y col., 2006) o tras la incineración o el terraplenado empleados en el desecho de los mismos (IPCS, 1992; ATSDR, 2002).

A pesar de que la fotodegradación atmosférica del DEHP es rápida, su hidrólisis química en el medio ambiente es prácticamente inexistente (Lertsirisopon y col., 2009). Los procesos de biodegradación en condiciones aerobias son importantes tanto en suelo



como en agua, aunque lentos e incluso escasos por debajo de los 10 °C o en condiciones anaerobias (Staples, 1997). Esto explica la presencia generalizada de concentraciones significativas de DEHP en nuestro entorno (ver Tabla 3).

	CANADÁ	EE.UU.	EUROPA	JAPÓN / ASIA
Aguas superficiales ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	336	137	50	15
Aguas subterráneas ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	-	470	1.4	18.4
Aguas de consumo ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	4.7	54	170	3.5
Aguas residuales ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	336	4400	1800	40
Sedimentos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	-	218	40	17
Lodos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	$4.4 \cdot 10^5$	$5.83 \cdot 10^7$	336	170

TABLA 3. Concentraciones máximas medias detectadas de DEHP (Clark y col., 2003).

Respecto a sus efectos adversos, sigue existiendo una gran controversia acerca del perfil toxicológico del DEHP, su modo de acción (MoA, del inglés *Mode of Action*) y los posibles riesgos para la salud humana y los ecosistemas. La mayoría de los datos disponibles en la actualidad acerca de la toxicidad del DEHP proceden de estudios experimentales *in vivo* en vertebrados. Existen evidencias suficientes de que la administración de este compuesto a roedores causa toxicidad en los órganos reproductores (Davis y col., 1994; Moore y col., 2001; Sharpe, 2001; Cammack y col., 2003; Corton y Lapinskas, 2005), hígado y riñón (Crocker y col., 1988; Woodward, 1990; David y col., 2000a,b; Kamijo y col., 2007), y aparato respiratorio (Magliozzi y col., 2003). Asimismo se han descrito efectos teratogénicos (Parks y col., 2000; Gao y col., 2003) y carcinogénicos (Huber y col., 1996; David y col., 2000a,b; Voss y col., 2005).

Los estudios sobre la genotoxicidad del DEHP han mostrado resultados contradictorios tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados positivos obtenidos en distintos trabajos no son necesariamente indicativos de la genotoxicidad del compuesto, ya que éste no parece inducir lesiones directas en el ADN en la mayor parte de los estudios, pudiendo interpretarse estos resultados a partir de vías diferentes, como la epigenética (ATSDR, 2002; Herrero y col., 2012).

Aunque no se dispone de información suficiente en humanos, los datos existentes demuestran la capacidad del DEHP de alterar parámetros reproductivos y del desarrollo, actuando como un modulador endocrino (Akingbemi y col., 2004; Love-



kamp-Swan y Davis, 2003; Sharpe e Irvine, 2004), reduciendo el tiempo de embarazo (Latini y col., 2003) y afectando al desarrollo embrionario (Lyche y col., 2009), la fertilidad (Rozati y col., 2002) y la calidad del esperma (Zhang y col., 2006; Hauser y col., 2007; Matsumoto y col., 2008). Por estos motivos se le considera un posible tóxico para la reproducción y el desarrollo cuando la exposición es lo suficientemente alta (NTP-CERHR, 2006), con efectos adversos comprobados en más de una especie animal. Los ftalatos pueden alcanzar el feto a través de la placenta o de la leche materna y afectar así al sistema endocrino en desarrollo, esencial para llevar a cabo determinadas funciones biológicas entre las que se encuentran la maduración sexual y la capacidad reproductora en adultos (Latini y col., 2006). Se ha descrito su capacidad disruptora endocrina como agonista o antagonista de estrógenos en distintas especies (NTP-CERHR, 2006; Carnevali y col., 2010).

La evaluación de los efectos biológicos de ftalatos como el DEHP en ambientes acuáticos supone un significativo desafío a causa de su baja solubilidad en agua y su tendencia a formar dispersiones coloidales por encima de una concentración de  $3 \mu\text{g l}^{-1}$ . Esto ha hecho que tanto Japón como la Unión Europea fijen esa concentración como la prevista sin efecto observable (PNEC, del inglés *Predicted No Effect Concentration*) para esta sustancia (Naito y col., 2006; ECB, 2008b). Sin embargo, muchos experimentos llevados a cabo en agua a concentraciones superiores a  $3 \mu\text{g l}^{-1}$  han marcado claramente una correlación entre la concentración y los efectos biológicos (Foget-Leray y col., 2005), por lo que el establecimiento de esta concentración umbral debería reconsiderarse (Oehlmann y col., 2009).

Los estudios llevados a cabo con ftalatos en anfibios han sido hasta la fecha menos exhaustivos que los desarrollados en peces y algunos invertebrados. Los efectos de los plastificantes en anfibios se han centrado en su toxicidad, su capacidad de inducir efectos teratogénicos y su actividad como disruptores endocrinos, especialmente los efectos sobre la reproducción, la diferenciación sexual y el sistema tiroideo. En cuanto al DEHP, en exposiciones de huevos de *Rana arvalis* a través de sedimentos se detectó un aumento en el porcentaje de eclosiones fallidas (Larsson y Thurén, 1987).

Trabajos con peces confirman que el compuesto se bioconcentra en estos organismos (Staples y col., 1997), aunque muestran resultados toxicológicos variados. Se ha demostrado la aparición de *intersex* en salmón atlántico (*Salmo salar*) expuesto a DEHP en la dieta (Norman y col., 2007) y la capacidad de este compuesto de alterar la espermatogénesis en machos adultos de pez cebra (*Danio rerio*) a concentraciones del compuesto presentes en la mayoría de los sistemas acuáticos (Uren-Webster y col., 2010). En pez medaka (*Oryzias latipes*), se ha sugerido una ac-

tividad antiestrogénica por el descenso en los niveles de vitelogenina, el índice gonadosomático y el porcentaje de hembras con oocitos maduros (Kim y col., 2002), se ha descartado su actividad estrogénica (Harris y col., 1997) y se ha descrito su papel como agonista estrogénico (Metcalf y col., 2001). Por último, se le ha atribuido una leve actividad estrogénica en extractos citosólicos de células hepáticas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), por su capacidad de unirse al receptor de estrógenos (Jobling y col., 1995).

Ya en invertebrados, concretamente en quironómidos, el DEHP ha demostrado inducir efectos subletales en *Chironomus riparius*, como descenso en las tasas de eclosión de huevos de la FI (Kim y Lee, 2004), retraso del desarrollo larvario y diferencias en el volumen corporal de las hembras y el peso de los machos (Kwak y Lee, 2005). Son varios los trabajos en los que se han analizado los niveles de expresión de distintos genes, proporcionando evidencias sobre la sobreexpresión de *hsp40* y *hsp90* (Park y Kwak, 2008a), que codifican para distintas proteínas de choque térmico. También se ha documentado un aumento de la expresión del gen que da origen a la proteína ribosomal S3 (Park y Kwak, 2012), del gen *ERR*, que codifica para un receptor relacionado con estrógenos (Park y Kwak, 2010), y del gen de la alcohol deshidrogenasa (Park y Kwak, 2009a). Por el contrario, el DEHP reprime la expresión del gen de la endopeptidasa (Park y Kwak, 2008b) y de la calponina (Park y Kwak, 2009b). En *Chironomus tentans* se ha comprobado un aumento en la expresión de genes de algunas proteínas de choque térmico y de la hemoglobina (Lee y col., 2006).

En un estudio con el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Roh y col., 2007) el DEHP mostró un elevado potencial de toxicidad aguda, produciendo un descenso en la longitud corporal y el número de huevos. Además, se comprobó la represión en la expresión de los genes *hsp16.1* y *hsp16.2*, mientras que aumentó la expresión del citocromo P450 (*CYP450*) y la glutatión S-transferasa (*GST*), genes relacionados con enzimas del metabolismo de xenobióticos.

A pesar de su importancia ecológica, anélidos y moluscos han recibido relativamente pocas atenciones en cuanto a la evaluación de los efectos de los plastificantes, en comparación con vertebrados y otros invertebrados como crustáceos e insectos (Weltje y Schulte-Oehlmann, 2007). Las primeras investigaciones en estos organismos se enfocaron hacia la bioacumulación y la toxicidad aguda del DEHP. En diferentes rangos de concentración, se comprobó que el compuesto se incorporaba en el gusano *Eisenia fetida* con un factor de acumulación relativamente bajo (Hu y col., 2005) y que tenía una toxicidad aguda baja en el anélido oligoqueto *Lumbricus variegatus* (Call y col., 2001). En

mejillones marinos (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos a DEHP se han detectado aumentos significativos en las actividades catalasa y acil-CoA oxidasa, así como una inhibición en la actividad superóxido dismutasa y de los niveles de manganeso superóxido dismutasa (Orbea y col., 2002).

Aunque no parece tener actividad estrogénica *in vivo* en mamíferos (Zacharewski y col., 1998), estudios *in vitro* en líneas celulares y extractos citosólicos de trucha arcoíris demuestran que el DEHP estimula la proliferación celular y se une al receptor de estrógenos (Jobling y col., 1995; Zacharewski y col., 1998; Blom y col., 1998). Los ftalatos no interaccionan con el receptor de andrógenos, pero interfieren con la transcripción de distintos genes clave involucrados tanto en el transporte de colesterol como en la biosíntesis de testosterona (Parks y col., 2000; Clewell y col., 2010). Por otro lado, estudios *in vitro* con roedores e insectos demuestran también que el DEHP es capaz de actuar con actividad anti-androgénica (Sohoni y Sumper, 1998; Vo y col., 2009) y se han descrito efectos de este compuesto en rutas fisiológicas involucradas en el metabolismo y la síntesis de hormonas esteroideas en microsomas de carpas, efectos que podrían conducir al desequilibrio entre estrógenos y andrógenos, afectando en última instancia a la capacidad reproductora de esta especie (Thibaut y Porte, 2004).

Como se desprende de toda esta información, sigue existiendo una gran controversia acerca del perfil toxicológico del DEHP, su mecanismo de acción y los posibles riesgos para la salud humana y medioambiental.

### 1.3. BUTIL BENCIL FTALATO (BBP)

El butil bencil ftalato se encuentra, al igual que el DEHP, recogido en la lista de sustancias candidatas propuesta por la Comisión Europea para su estudio por sus propiedades en materia de disrupción endocrina (EC, 2000). Está asimismo entre las 144 sustancias que suscitan especial preocupación (ECHA, 2008a). El Reglamento (CE) n° 1272/2008 clasifica al BBP como tóxico para la reproducción y lo incluye también en la categoría 1B. Además, lo clasifica como peligroso para el medio ambiente acuático en las categorías agudo 1 y crónico 1 (ver Tabla 4). Actualmente se encuentra clasificado también, de acuerdo al Anexo 1A de la Directiva 2004/73/CE, como tóxico para la reproducción, categorías 2 y 3, por sus efectos sobre la salud humana (ver Tabla 4). Asimismo, según esta Directiva se clasifica como peligroso para el medio ambiente por sus efectos adversos.

<b>Reglamento (CE) n° 1272/2008</b>		
Pictogramas de peligro	GHS08 GHS09	Peligro
Código de peligro	H360Df H410	Puede perjudicar a la fertilidad. Se sospecha que daña al feto.
Consejos de prudencia	P201 P273 P308+P313 P501	Solicitar instrucciones especiales antes del uso. Evitar su liberación al medio ambiente. En caso de exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico. Eliminar el contenido/el recipiente de acuerdo a la regulación pertinente.
<b>Directiva 2004/73/CE</b>		
Pictogramas de peligrosidad	T N	Tóxico Peligroso para el medio ambiente
Advertencias sobre riesgos	R61-62-50/53	Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad. Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
Consejos de seguridad	S53-45-60-61	Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta). Elimínense el producto y su recipiente como productos peligrosos. Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

TABLA 4. Resumen de la información relevante sobre el BBP que debe aparecer en las fichas de datos de seguridad (FDS), según el Reglamento (CE) n° 1272/2008 y la Directiva 2004/73/CE.

El BBP es un líquido incoloro y poco soluble en agua. La separación del BBP de los materiales que lo contienen y su entrada en el medio ambiente se produce fundamentalmente a partir de los residuos depositados en vertederos y los procesos de incineración. Se ha documentado también una importante fuente de BBP a partir de los lodos provenientes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), que en muchos casos son eliminados finalmente como residuos en vertederos y en otros son empleados como enmiendas orgánicas para la fertilización de suelos (de la Peña y Herrero, 2005; ECB, 2007).

El 95% de su producción en la Unión Europea se emplea como plastificante en la fabricación de PVC (sobre todo pavimentos) u otros polímeros como selladores, adhesivos, pinturas, tintas y barnices (NTP-CERHR, 2003). También se usa como intermediario

orgánico, solvente y fijador en perfumes (ECB, 2007). En el periodo entre 1994 y 1997 había tres productores de BBP en la Unión Europea. La producción anual en aquellos años fue de 45000 toneladas y se estima que en 2004 fueron 19000 las toneladas que se emplearon en el marco de la Unión Europea. Su uso ha ido disminuyendo considerablemente en los últimos años debido precisamente a sus distintas clasificaciones como tóxico y peligroso para el medio ambiente (ECB, 2007).

Se detallan a continuación sus principales características físico-químicas:

#### Butil bencil ftalato (BBP)

Número CAS	85-68-7
Fórmula Molecular	$C_{19}H_{20}O_4$
Peso Molecular	312.35 g mol <sup>-1</sup>
Punto de fusión	-40.5 °C
Punto de ebullición	370 °C
Presión de vapor	$6 \times 10^{-7}$ mmHg a 25 °C
Solubilidad en agua	2.7 mg l <sup>-1</sup>
Log Kow	4.59

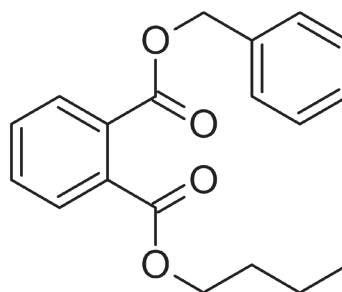


TABLA 5. Principales características físico-químicas del BBP (NTP-CERHR, 2003).

Casi todos los ftalatos consumidos en el interior de la Unión Europea, incluyendo el BBP, son transportados en cisternas por carretera (Cadogan, 1994; ECPI, 1996). Durante su distribución se producen pérdidas debidas a la limpieza de las cisternas, estimándose que la cantidad de BBP liberado a ambientes acuáticos a causa de esto es de 2.1 toneladas anuales, lo que facilita enormemente su presencia ubicua en el medio ambiente (ver Tabla 6).

Los procesos de degradación abióticos para este compuesto son poco significativos, siendo el más importante la fotodegradación en el aire, para el que se estima una vida media de 1.5 días. Las tasas de degradación por hidrólisis y fotólisis son insignificantes, con vidas medias superiores a los 28 y 100 días en cada caso. Por el contrario, se ha comprobado que el BBP se biodegrada rápidamente una vez superados los diez primeros días, pudiendo sufrir su biodegradación final en condiciones anaerobias en lodos y sedimentos. En base a su coeficiente de reparto octanol-agua y su elevado factor de bioconcentración, se considera que tiene un alto potencial de bioacumulación, lo que facilita su persistencia en las cadenas tróficas (ECB, 2007), sobre todo en aquellos organismos con una limitada capacidad para metabolizarlo.

	CANADÁ	EE.UU.	EUROPA	JAPÓN / ASIA
Aguas superficiales ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	84	66	13.9	1
Aguas subterráneas ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	-	38	0.24	-
Aguas de consumo ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	2.8	38	< 0.1	-
Aguas residuales ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	84	449	30	1.5
Sedimentos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	370	5.5	18.2	0.02
Lodos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	$1.4 \cdot 10^4$	-	$2.1 \cdot 10^5$	-

TABLA 6. Concentraciones máximas medias detectadas de BBP (Clark y col., 2003).

Los estudios sobre los efectos adversos del BBP y sus posibles consecuencias para la salud humana y la de los ecosistemas son mucho menos numerosos que los que se pueden encontrar en el caso del DEHP, incluso a pesar de los claros efectos negativos por los que se le ha clasificado según distintas normativas, como se ha comentado con anterioridad. Son extrapolables a este compuesto resultados experimentales comunes a los ftalatos como grupo químico, los cuales se han comentado previamente.

De manera general, los estudios *in vivo* en vertebrados se han centrado en peces. En un trabajo con machos del ciprínido *Pimephales promelas* se demostró que el BBP es estrogénico y que induce la síntesis de vitelogenina (Harries y col., 2000). Los resultados concuerdan con los efectos detectados *in vitro*, donde se ha comprobado su capacidad de unirse al receptor de estrógenos y desencadenar una leve respuesta estrogénica en células de pez en cultivo (Jobling y col., 1995). En embriones de *P. promelas* produjo un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica y en la expresión de genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo de xenobióticos (citocromos, catalasa y receptor de andrógenos) (Mankidy y col., 2013). También se ha comprobado que exposiciones a BBP en agua son capaces de alterar el comportamiento de los peces, en este caso *Gasterosteus aculeatus* (Wibe y col., 2002, 2004). Estudios en pez cebra (*Danio rerio*) han propuesto un papel protector de la calidad del esperma ante situaciones de estrés oxidativo (Oehlmann y col., 2009), posiblemente a través de la interacción del compuesto con el receptor PPAR (Corton y Lapinskas, 2005).

Estudios *in vitro* han comprobado que el BBP se une al receptor de estrógenos (Jobling y col., 1995; Zacharewski y col., 1998; Blom y col., 1998). La activación de este receptor resultó escasa en estudios en la línea celular MVLN, donde además se comportó como un agonista débil, mostrando por otro lado propiedades citotóxicas y capacidad de inducir la apoptosis por medio de la activación de la caspasa-3 (Mankidy y col., 2013).

Centrándonos en invertebrados, son muy pocos los trabajos disponibles en la literatura científica acerca de los efectos tóxicos del BBP. Se han comprobado descensos significativos en la actividad fenoloxidasa y superóxido/reductasa en el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Sung y col., 2003), así como efectos adversos sobre la embriogénesis y el desarrollo larvario en el univalvo marino *Haliotis diversicolor supertexta* (Liu y col., 2009) y el éxito reproductivo y la esperanza de vida en el microcrustáceo de agua dulce *Moina macropopa* (Wang y col., 2011). No existen hasta la fecha datos relativos a los efectos sobre larvas de *Chironomus riparius*.

## 2. LA EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

A pesar del reciente aumento de los trabajos de investigación relacionados con la ecotoxicidad de los ftalatos, los estudios sobre su impacto biológico en invertebrados, en especial sobre los organismos bénticos, es muy limitado en comparación con los estudios de evaluación del riesgo en humanos. Debido a la importancia ecológica de este tipo de organismos, cada vez son más los esfuerzos encaminados a determinar el efecto producido por estos compuestos potencialmente bioacumulables y sus propiedades como disruptores endocrinos, que los hace capaces de desequilibrar los ecosistemas. Debido a ello, son numerosos los informes a nivel internacional que abogan por la necesidad de conocer en detalle los efectos que provocan en estos grupos animales (Kang y col., 2007; Soin y Smagghe, 2007).

Directamente relacionado con esta necesidad de evaluar el impacto ecotoxicológico de las sustancias y preparados químicos, se encuadra el creciente interés general que en las últimas décadas ha suscitado la conservación de los ecosistemas naturales. La proximidad de multitud de núcleos poblacionales e industriales a medios dulceacuícolas, sobre todo a los cursos bajos de grandes ríos, hace que este tipo de medios se haya contemplado históricamente como una opción sencilla y económica para dar salida a todo tipo de residuos, convirtiéndose por ello en elementos prioritarios en la evaluación del riesgo químico. El elevado número de productos químicos que entran en los ecosistemas acuáticos, bien a causa de vertidos directos, bien por contaminación difusa procedente del medio terrestre, hace que cualquier intento de caracterización química se convierta en una tarea con un elevado coste de tiempo y dinero. Es en este punto donde cobran importancia los métodos de detección y evaluación de la toxicidad basados en el estudio de los efectos de estos productos sobre organismos indicadores.



Actualmente, un importante número de alternativas en Toxicología ambiental se basan en el empleo de organismos inferiores y/o no protegidos por la legislación actual. Dentro de los principales objetivos del Reglamento REACH se encuentra el fomentar los métodos alternativos a la experimentación animal para evaluar los riesgos de las sustancias y preparados químicos, definiéndose como «métodos alternativos» todos aquellos procedimientos que pudieran sustituir a los experimentos realizados con animales, reducir el número de éstos empleado en cada ensayo, o refinar protocolos ya existentes con el fin de disminuir el estrés y el sufrimiento infligido a los mismos (Russell y Burch, 1959).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, del inglés *Organisation for Economic Co-operation and Development*), organismo internacional fundado en 1961, lleva más de 40 años trabajando en materia de seguridad química (OECD, 2011a) a través de su Comité de Política Medioambiental (EPOC, del inglés *Environment Policy Committee*). A lo largo de este tiempo ha abordado múltiples materias de elevado interés en la evaluación toxicológica de las sustancias químicas: grupos químicos, ensayos de laboratorio, pesticidas, biocidas, modelos de regresión para relaciones estructura-actividad (QSAR), nanomateriales, entre otros. Desde finales de 1970, la OECD viene desarrollando una serie de directrices para la evaluación de las sustancias químicas (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*), las cuales sirven de referencia internacionalmente y son empleadas para fines regulatorios en el marco legislativo de multitud de países. En la actualidad se encuentran publicados alrededor de 100 métodos de ensayo de relevancia internacional, empleados por los gobiernos, la industria y laboratorios independientes para identificar y caracterizar los riesgos potenciales de las sustancias químicas, los preparados y las mezclas. Cada uno de ellos proporciona descripciones detalladas de cómo han de llevarse a cabo los estudios de laboratorio y cómo han de presentarse los resultados de los mismos. El objetivo último, recogido igualmente en el Reglamento REACH, es facilitar a la industria química los pasos a seguir para llevar a cabo correctamente los estudios de seguridad química.

Descritos en estas directrices se encuentran ensayos de laboratorio orientados a estudios de efectos sobre sistemas bióticos, de efectos sobre la salud, de degradación y acumulación, de propiedades físico-químicas y otros. Es entre los dos primeros grupos donde coexisten gran variedad de organismos de ensayo, desde bacterias hasta mamíferos, pasando por levaduras, plantas, insectos, peces, etc. Todos ellos son considerados buenos indicadores toxicológicos para dianas concretas, en función de los efectos que se deseen analizar.

Entre los ensayos orientados a la evaluación toxicológica de sustancias químicas en medios acuáticos, la familia de los quironómidos (y dentro de ésta el género



*Chironomus*) juega un papel importante y cuenta con cuatro ensayos estandarizados y aceptados internacionalmente con fines regulatorios (Hill y col., 1993; EPA, 1996a,b; *Environment Canada*, 1997; EPA, 2000; ASTM, 2010; Reglamento (UE) n° 544/2011, Reglamento (UE) n° 528/2012). En todos ellos se utilizan especies bien caracterizadas de quironómidos (*C. tentans*, *C. riparius*, *C. dilutus* o *C. yoshimatsui*), a cuyos individuos se les somete a exposiciones agudas y/o crónicas de compuestos químicos (desde 24 horas hasta dos generaciones), bien disueltos en agua, bien formando parte del sedimento en el que se desarrollan. Entre las posibles dianas de estudio se incluyen la inmovilización, el porcentaje de huevos que llegan a eclosionar, la mortalidad/supervivencia de las larvas, la concentración efectiva ( $EC_x$ , del inglés *Effective Concentration*), la menor concentración con efecto observado (LOEC, del inglés *Lowest Observed Effect Concentration*), la concentración sin efecto observado (NOEC, del inglés *No Observed Effect Concentration*), la duración del desarrollo, el peso, la reproducción, la fertilidad de los adultos y el ratio entre machos y hembras:

- Test No. 218: *Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment* (OECD, 2004a).
- Test No. 219: *Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water* (OECD, 2004b).
- Test No. 233: *Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment* (OECD, 2010).
- Test No. 235: *Chironomus sp., Acute Immobilisation Test* (OECD, 2011c).

El empleo de biomarcadores moleculares en organismos acuáticos resulta de gran importancia para hacer frente a la amplia gama de productos químicos industriales, agrícolas, comerciales y domésticos que entran en el medio ambiente, sobre todo en el medio acuático, y que pueden ser incorporados y acumulados en los tejidos de los organismos presentes en ese tipo de ecosistemas.

En los estudios ecotoxicológicos se están utilizando los biomarcadores para determinar el riesgo que la contaminación del medio ambiente conlleva para componentes clave de los ecosistemas. El supuesto básico es que mediante el control de las consecuencias negativas para las especies que ocupan posiciones importantes en el nivel trófico del ecosistema se puede predecir el estado de salud del ecosistema en su conjunto, pudiendo utilizarse la determinación de la toxicidad en especies sensibles (especies centinela) como una advertencia temprana y ecológicamente relevante del deterioro de una población.

## 2.1. *Chironomus* COMO MODELO DE ESTUDIO

Los quironómidos son una familia de dípteros nematóceros ampliamente distribuida en todo el mundo, no existiendo prácticamente una masa de agua en la cual no puedan vivir sus larvas y representando frecuentemente el grupo de insectos más abundante y diversificado en medios acuáticos continentales. Constituyen un elemento clave en las cadenas tróficas de este tipo de ecosistemas (Berg y Hallenthal, 1992), ya que resultan primordiales en la dieta de numerosas especies acuáticas y terrestres, en especial de peces y aves acuáticas (Rieradevall y col., 1995).

Su ciclo vital comprende cuatro estados de duración desigual: huevo, larva, pupa e imago (ver Figura 2). Los tres primeros se desarrollan en todo tipo de medios acuáticos, incluyendo hábitats tan especializados como el agua axilar de plantas, troncos huecos (dendrotelmata), fuentes termales, charcas intermareales, etc. (Cobo, 1988). El desarrollo de *Chironomus* tiene una duración variable, dependiendo fundamentalmente de la temperatura y la disponibilidad de alimento. En las condiciones de cultivo de laboratorio, a una temperatura entre 18 °C y 20 °C, el ciclo vital de un individuo se completa en tres o cuatro semanas.

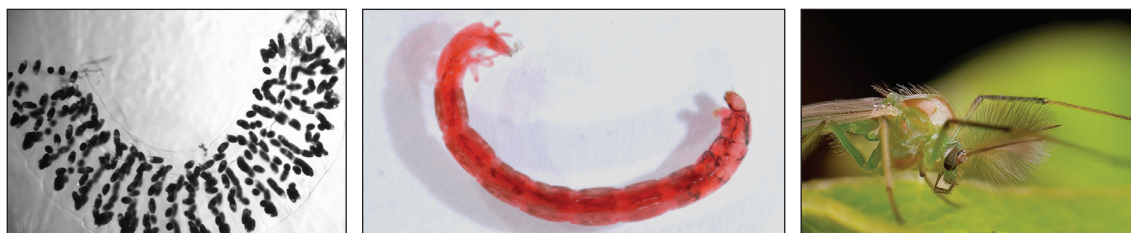


FIGURA 2. Distintos estados en el desarrollo de *Chironomus riparius*. De izquierda a derecha, masa de huevos, larva de estadio IV y macho adulto (cortesía de Brian Valentine <http://www.flickr.com/photos/lordv/>).

Las larvas de quironómidos son apnéusticas, con tráqueas no funcionales por la ausencia de espiráculos abiertos, por lo que dependen de la existencia de altos niveles de oxígeno para asegurar un gradiente de difusión suficiente. Las especies que viven enterradas en sedimentos con alto contenido en materia orgánica pueden verse sometidas a disminuciones drásticas de la concentración de oxígeno en unos pocos milímetros de profundidad (Watling, 1991). Por ello, larvas de muchas especies, entre ellas *C. riparius*, presentan hemoglobina en el líquido circulatorio en una concentración proporcional al déficit local de oxígeno (Weber y col., 1985), lo que les permite desarrollarse en condiciones variables de hipoxia y les proporciona un llamativo color rojo.

Estas larvas han sido consideradas tradicionalmente un organismo modelo tanto en estudios de contaminación natural o antropogénica (Giesy y col., 1990; Hoke y col., 1993; Pellinen y Soimasuo, 1993; Brown y col., 1996) como en análisis de bioacumulación de contaminantes tóxicos asociados a sedimentos (Ankley y Schubauer-Berigan, 1994; Harrahy y Clements, 1997; ECB, 2008). Se han empleado para ello tanto poblaciones naturales como cultivadas y mantenidas en laboratorio (Chappie y Burton, 1997; Bleeker y col., 1998; Stuijzand y col., 1998; Tucker y Burton, 1999).

En los últimos años han cobrado mayor relevancia como indicadores de efectos teratogénicos los estudios de malformaciones y asimetrías como consecuencia de la exposición a tóxicos, generalmente en las piezas bucales (Martínez y col., 2002; Servia y col., 2004). Asimismo, han aparecido numerosos trabajos donde por primera vez se buscan biomarcadores moleculares de toxicidad, entre los que encontramos el estudio del efecto de insecticidas organofosforados en las actividades enzimáticas como la acetil colinesterasa (AChE) y la glutation-S-transferasa (GST) (Fisher y col., 2000; Callaghan y col., 2002; Domingues y col., 2009). Se han presentado igualmente como potenciales biomarcadores el nivel de autooxidación de las hemoglobinas (Choi y Roche, 2004; Lee y col., 2006) y, más recientemente, los cambios en los niveles de expresión de genes implicados en distintas rutas metabólicas y de señalización (Londoño y col., 2004; Martínez-Guitarte y col., 2007; Park y Kwak, 2008a, 2009; Planelló y col., 2007, 2008, 2010; Morales y col., 2011; Martínez-Paz y col., 2012; Ozáez y col., 2013).

### **3. APROXIMACIÓN AL DISEÑO EXPERIMENTAL: SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTUDIO**

Los biomarcadores constituyen una herramienta fundamental a la hora de valorar el riesgo de la exposición a compuestos tóxicos y sus efectos sobre los seres vivos (*National Research Council*, 1987; Rotchell y Ostrander, 2003; Ostrander, 2005; Porte y col., 2006). No sólo son útiles para determinar si la salud de las especies acuáticas se ha visto alterada en un área contaminada, sino también para comprobar si los parámetros toxicológicos estudiados recuperan los valores normales una vez superado un episodio de contaminación puntual, ya sea de forma natural o tras un proceso de biorremediación (Cajaraville y col., 2000).

La rápida evolución de las técnicas moleculares ha permitido una nueva aproximación en las ciencias ambientales en lo que se refiere a la evaluación del riesgo, asociando respuestas moleculares y ecotoxicológicas. El interés en la genómica ambiental, un campo emergente que combina técnicas moleculares de alto rendimiento en poblaciones naturales con los actuales enfoques ecotoxicológicos, alimenta el desarrollo presente y futuro de herramientas moleculares desde una perspectiva ecológica (Asselman y col., 2012). De este modo, se posibilita un conocimiento más profundo de las respuestas específicas de los organismos a contaminantes (Poynton y col., 2007; Shaw y col., 2007; Schwarzenberger y col., 2009). Por otro lado, la correcta identificación y comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a estas respuestas conducirá a una evaluación del riesgo más eficaz (Amiard y col., 2006; Watanabe y col., 2007).

Por ello, en esta tesis se ha empleado un modelo experimental basado en la selección de determinados parámetros subcelulares y moleculares de *C. riparius*, con el fin de valorar su posible utilidad como biomarcadores de exposición temprana a DEHP y BBP.

La alta sensibilidad de las técnicas de PCR facilita los trabajos de investigación desde una perspectiva molecular gracias a la detección temprana de señales de estrés o de procesos de detoxificación (Forbes y col., 2006; Piña y col., 2007), permitiendo además la cuantificación de los ARNm a partir de niveles muy bajos de los genes transcritos (Panti y col., 2011). Aunque los cambios en los patrones de proteínas son en última instancia los responsables de un efecto fisiológico en los seres vivos, la detección temprana de variaciones en el patrón de actividad génica, expresada en términos de alteraciones en los niveles de ARN, resulta una aproximación de gran utilidad para analizar los daños provocados por la exposición a tóxicos.

### **3.1. EXPRESIÓN GÉNICA EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS: ANILLOS DE BALBIANI**

Los cromosomas politénicos de dípteros han sido históricamente de gran relevancia en el estudio de la transcripción génica. Son característicos de las glándulas salivales, producidos por una elevada sucesión de procesos de replicación del ADN sin que se lleve a cabo la división celular (endoreplicación), lo que origina que cada cromosoma esté constituido por un gran número de cromátidas hermanas.

A lo largo del cromosoma politénico se observan bandas características que varían en tamaño y morfología (ver Figura 3). Además, hay regiones que a veces aparecen hinchadas

(engrosamientos o *puffs*) y en ocasiones muy distendidas (anillos de Balbiani), correspondiéndose con zonas transcripcionalmente activas (ver Figura 4).

En *Chironomus*, los anillos de Balbiani (BRs del inglés *Balbiani Rings*) se utilizan como modelo en estudios de expresión génica por presentar un grado de activación transcripcional específico de las distintas etapas del desarrollo larvario. Su importancia radica en que codifican para una familia de proteínas de secreción gigantes (Rydlander y Edström, 1980; Cortés y col., 1989) empleadas en la construcción del tubo larvario, una estructura que alberga a las larvas acuáticas y se emplea en su alimentación y su protección (Grossbach, 1977).

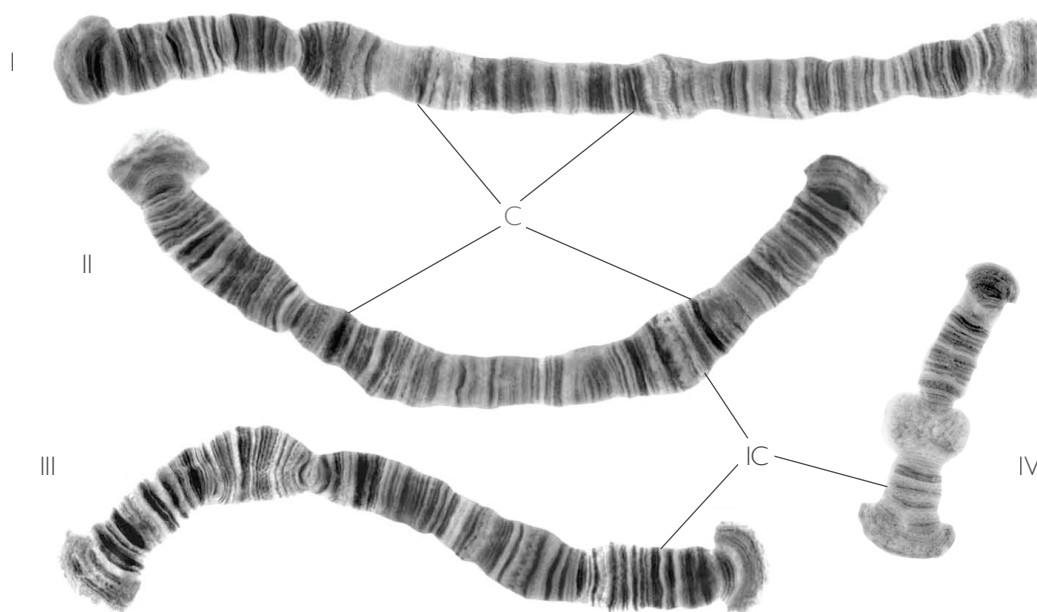


FIGURA 3. Cromosomas politénicos (I, II, III y IV) de las glándulas salivales de *Chironomus* sp., con su característico patrón de bandas. Las bandas oscuras representan zonas en las que el ADN está más plegado, denominadas cromómeros (C), mientras que en las bandas claras o interbandas, denominadas regiones intercromoméricas (IC), hay un menor grado de plegamiento. Modificado de Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (<http://www-sbras.nsc.ru/en/>).

Existen varios genes en el cromosoma IV de *C. riparius* relacionados con las proteínas gigantes de secreción, entre los que cabe destacar el *BR1* y el *BR2*. Como se ha mencionado, estos genes presentan diferente grado de transcripción en función del estadio larvario. Así, mientras el *BR2* se encuentra activo a lo largo de todo el desarrollo larvario, la actividad del *BR1* aumenta a medida que la larva se acerca al estado de pupa.

La expresión de los genes *BR* en *Chironomus* ofrece posibilidades únicas de visualizar el ensamblaje y el transporte nucleocitoplásmico de un producto de transcripción específico, así como de llevar a cabo estudios de expresión génica *in situ* (Bauren y Wieslander, 1994; Daneholt, 2001; Kiesler y col., 2002). Dado que la expresión de los genes de esta familia sufre cambios dependientes del ambiente, y conocido el papel protector de las proteínas para las que codifican, cambios en sus patrones de expresión pueden emplearse como indicadores moleculares de una respuesta defensiva frente al estrés que pueden producir las variaciones en el medio donde se desarrollan las larvas (Nair y col., 2011), como la presencia de sustancias químicas.

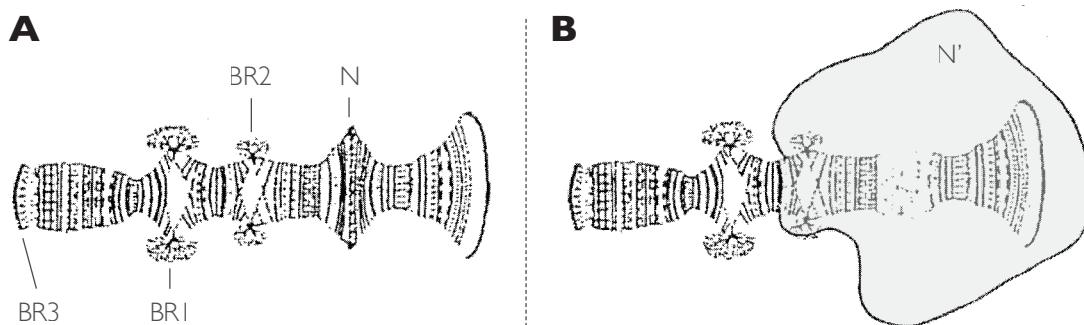


FIGURA 4. Representaciones esquemáticas del cromosoma IV de *C. riparius*. En la figura A se marcan los anillos de Balbiani (BR1, BR2 y BR3) y el nucléolo en su estado condensado (N). En la figura B se sombrea en gris el área ocupada por el nucléolo en estado expandido (N'). Modificado de Meregalli y col., 2002.

### 3.2. NUCLÉOLO Y BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

La producción de ribosomas en organismos eucariotas implica dos procesos esenciales, ambos sujetos a mecanismos de control muy estrictos para asegurar el correcto funcionamiento celular. El primero es la síntesis del ARN prerribosómico 47S (45S en insectos), que debe madurar dando lugar a los distintos tamaños de ARNr de los organismos eucariotas en un proceso que tiene lugar en el nucléolo. El segundo lo constituye la síntesis de las proteínas ribosómicas, que se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso (RER) vía ARNm. Ambos componentes (ARNr y proteínas ribosómicas) se ensamblan junto con el ARN 5S en el nucléolo para dar lugar a las subunidades grande y pequeña de los ribosomas (Gébrane-Younes y col., 2005). La

importancia de ambos componentes es evidente, ya que su ensamblaje origina la maquinaria que permite la síntesis de todas las proteínas, algo esencial para la célula.

El nucléolo, descrito por Fontana en 1781, puede definirse como «la fábrica de ribosomas de la célula» y ha sido constantemente objeto de investigaciones con el fin de profundizar en su funcionalidad, estructura e incluso relación con determinadas patologías (Olson, 2004).

La organización del nucléolo pone de manifiesto una compartimentalización de sus funciones que depende en última instancia de su actividad. Aunque la principal función de esta región del cromosoma se relaciona claramente con la biogénesis ribosómica, el nucléolo contiene también moléculas implicadas en otras funciones. Así, se ha descrito como un orgánulo sensible a situaciones de estrés celular (Olson, 2004), siendo especialmente llamativa su sensibilidad al estrés oxidativo, situación que provoca una disminución de la actividad transcripcional de los genes ribosómicos (Mayer y Bukau, 2005). En *Chironomus* existen estudios que describen cambios en el nucléolo tras la exposición a determinados tóxicos (Aziz y col., 1991; Hudson y Ciborowski, 1996; Bettinetti, 2000). En concreto, en *C. riparius* se ha relacionado la presencia de deformidades en las piezas bucales con el incremento de la actividad del nucléolo en larvas recolectadas de zonas contaminadas (Meregalli y col., 2002) y se ha comprobado el efecto inhibitorio de la exposición a cadmio sobre la función nucleolar (Planelló y col., 2007).

Hasta el momento se han identificado más de 80 proteínas ribosómicas diferentes en organismos eucariotas, si bien en *Chironomus* sólo se han secuenciado completamente los genes para las proteínas ribosómicas L8 (Govinda y col., 2000), L11, L13 (Martínez-Guitarte y col., 2007), L15 (Nair y Choi, 2011a), S3 y S6 (Park y Kwak, 2012).

El descubrimiento de que algunas proteínas ribosómicas realizan funciones adicionales a las relacionadas con la biogénesis de los ribosomas, tales como reguladoras y estructurales, ha añadido interés adicional al estudio de los genes que las codifican. En este sentido, se ha sugerido que L11, L13 y L15 podrían participar en la regulación transcripcional, razón por la cual el estudio de los efectos que pudieran tener determinados compuestos tóxicos sobre los genes que codifican para estas proteínas resulta especialmente interesante (Chen y Ioannou, 1999; Planelló y col., 2008; Martínez-Guitarte y col., 2007; Nair y Choi, 2011a).



### 3.3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y RESPUESTA CELULAR A ESTRÉS

La respuesta de las células al estrés provocado por variaciones bruscas en las condiciones del medio ambiente constituye un mecanismo genético altamente conservado en la historia evolutiva de los seres vivos. Esta respuesta al estrés ha sido descrita en organismos muy distantes a nivel evolutivo, desde arqueobacterias hasta eucariotas superiores (Lindquist, 1986; Lindquist y Craig, 1988; Parsell y Lindquist, 1993; Feder y Hofmann, 1999) y se caracteriza principalmente por modificaciones drásticas en la expresión génica (transcriptoma y proteoma) que permiten a las células sobrevivir en condiciones adversas e incluso desarrollar estrategias adaptativas.

Inicialmente denominada «respuesta al choque térmico», se describió por primera vez en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de larvas de *Drosophila buschii*, en los cuales se apreciaron cambios en el patrón de los *puffs* tras una exposición accidental a temperaturas elevadas, formándose algunos nuevos y desapareciendo otros existentes en condiciones normales (Ritossa, 1962). Posteriormente, los *loci* contenidos en esas zonas transcripcionalmente activas se relacionaron con la síntesis de los transcritos de una serie de nuevas proteínas, que fueron denominadas «proteínas de choque térmico» (HSPs, del inglés *Heat Shock Proteins*) (Tissières y col., 1974). A pesar de esa denominación inicial, existe una amplia variedad de estímulos capaces de desencadenar este tipo de respuestas típicamente asociadas a estrés térmico, como la radiación ultravioleta, el estrés oxidativo, la exposición a metales pesados o la falta de nutrientes, entre otros (Morimoto y col., 1992). Esta implicación generalizada en respuestas desencadenadas frente a la presión ambiental ha hecho que en la actualidad también se las conozca como «proteínas de estrés», aunque conviene destacar que las HSPs no sólo actúan en este tipo de situaciones, sino que algunas también pueden encontrarse activas de manera constitutiva en situaciones de normalidad (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

Las HSPs desempeñan un papel fundamentalmente defensivo, ya que desencadenan procesos que protegen a las células de los efectos dañinos del calor u otras situaciones de estrés, como la exposición a sustancias químicas de naturaleza diversa. En el caso de *C. riparius*, cuando se somete a las larvas a un incremento de temperatura sobre la normal del cultivo (p.ej. 2 horas a 35 °C), sus células experimentan una disminución generalizada de la actividad transcripcional en la mayoría de los genes activos y, contrariamente, el aumento en la cantidad de estas proteínas por la activación de los *loci* que codifican para ellas (Morcillo y col., 1993, 1997).



Entre las funciones celulares en las que participan las proteínas de choque térmico que serán evaluadas en este trabajo, se pueden destacar las siguientes:

<b>PROTEÍNA</b> (localización)	<b>FUNCIONES</b>
HSC70 (citósol)	Se expresa de forma constitutiva y coopera con chaperonas interaccionando con gran número de moléculas para llevar a cabo múltiples funciones celulares. Prevención de plegamientos prematuros o formación de agregados durante la síntesis proteica, traslado de polipéptidos precursores a través de las membranas de la mitocondria, del retículo endoplásmico y de lisosomas. Disociación de complejos proteicos. Interacción con la bicapa lipídica, afectando a la fluidez de la membrana celular. Relocalización en el núcleo ante situaciones de estrés (Liu y col., 2012).
HSP70 (citósol)	Se expresa de forma inducible ante situaciones de estrés. Tolerancia a hipertermia, tolerancia a hipoxia, recuperación de la actividad transcripcional y traduccional tras choque térmico, regulación de la respuesta a choque térmico, tolerancia a endotoxina, reducción de la desnaturalización proteica por exposición a calor, formación de tumores, proliferación celular, resistencia a peróxido de hidrógeno, resistencia de células tumorales a monocitos, sensibilidad a células asesinas activadas por linfocinas, salida del arresto del ciclo celular inducido por drogas, glucosilación de proteínas, tolerancia a radiación ultravioleta, apoptosis, resistencia a apoptosis (Feder y Hofmann, 1999). Implicada como chaperona en el plegamiento de proteínas (Mayer y Bukau, 2005), entre ellas el receptor hormonal de la ecdisona (Gehring, 1998).
HSP40 (citósol)	Modulación de la actividad de PKR y de la traducción de ARNm, mediante la inhibición de la actividad de p58 (Melville y col., 1997). Unión a proteínas mal plegadas, prevención de la formación de agregados proteicos y entrega a HSP70, estimulación de la actividad ATPasa de HSP70, unión a componentes de la maquinaria de degradación proteica (Feder y Hofmann, 1999). Resistencia a virus (Knox y col., 2011).
HSP27 (citósol)	Resistencia a drogas quimioterapéuticas, resistencia a peróxido de hidrógeno, resistencia a radiación ultravioleta, resistencia de células tumorales a monocitos, sensibilidad a células asesinas activadas por linfocinas, tolerancia a hipertermia, resistencia al factor de necrosis tumoral, tolerancia a isquemia, resistencia de los polímeros de actina a citocalasina, aceleración de la agregación de proteínas nucleares, disminución acelerada de la radiosensibilización térmica (Feder y Hofmann, 1999). Regulación de la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo (Sasaki y col., 2011). Inhibición de apoptosis (Acunzo y col., 2012). Alteración de la respuesta inflamatoria en infecciones víricas (Rajaiya y col., 2012).

TABLA 7. Principales funciones celulares en las que participan las proteínas de choque térmico estudiadas en este trabajo.

<b>PROTEÍNA</b> (localización)	<b>FUNCIONES</b>
HSP10 (mitocondria)	Plegamiento de proteínas dentro de las mitocondrias en conjunto con HSP60 (Ryan y col., 1997). Tolerancia a hipoxia, tolerancia a isquemia (Feder y Hofmann, 1999). Implicada en el desarrollo embrionario (Athanasas-Platsis y col., 2000) y la progresión de tumores (Akyol y col., 2006). Señalización celular y posible modulación del sistema inmune (David y col., 2013).

TABLA 7. Principales funciones celulares en las que participan las proteínas de choque térmico estudiadas en este trabajo.

En el ámbito intracelular, las HSPs actúan como chaperonas, facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas y la translocación de oligómeros, pero también favorecen la eliminación de las proteínas que están dañadas de forma irreversible (Madrigal-Matute y col., 2009). Participan en el control de calidad de proteínas mal plegadas y en el plegamiento postraducciona l de proteínas de nueva síntesis. Ese control se lleva a cabo básicamente mediante tres mecanismos: previniendo la formación de agregados, promoviendo el plegamiento hacia el estado nativo y solubilizando y volviendo a plegar proteínas agregadas (Mayer y Bukau, 2005).

En todos los organismos estudiados hasta la fecha se han descrito genes que codifican para las principales familias de proteínas de choque térmico, que se dividen en dos grandes grupos: las que se expresan de forma constitutiva (en condiciones normales) y las que lo hacen de modo inducible (frente a un estímulo). Algunas de estas proteínas están entre las más abundantes de la célula y muchas tienen su localización en distintos orgánulos celulares. Las HSPs se agrupan en función de dos características: su homología de secuencia y su peso molecular. Estas familias incluyen proteínas que pueden diferir en su localización, su función o su capacidad de ser inducidas en respuesta a un aumento de temperatura u otras situaciones de estrés (Pratt y Toft, 2003; Whitesell y Lindquist, 2005; Mayer y Bukau, 2005).

Son muchos los trabajos con *C. riparius* en los que se aporta información sobre la variación en los niveles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas frente a una exposición a contaminantes ambientales de naturaleza variada (Lee y col., 2006; Planelló y col., 2008; Park y Kwak, 2008a; Langer-Jaesrich y col., 2010; Planelló y col., 2010; Morales y col., 2011; Nair y Choi, 2011a). Estos eventos moleculares tempranos pueden ser de gran utilidad como biomarcadores ecotoxicológicos y permitir valorar la salud de ecosistemas sometidos a condiciones de estrés, dado el alto grado de conservación de este tipo de respuestas en distintos organismos. Aun así, siguen siendo necesarios

estudios que valoren la sensibilidad y la especificidad de estas técnicas de cara a su aplicabilidad en las evaluaciones del riesgo, aspectos en los que sin duda alguna se seguirá profundizando en los próximos años.

### 3.4. RUTA HORMONAL DE LA ECDISONA

El crecimiento y la metamorfosis completa que sufren los insectos holometábolos (entre los que se encuentran los dípteros) a lo largo de su desarrollo, desde el huevo al estado adulto, se regula principalmente por dos tipos de hormonas, las ecdisoesteroideas y la hormona juvenil (JH, del inglés *Juvenile Hormone*) (Riddiford, 1993). Estos insectos atraviesan diferentes estados larvarios (estadios) hasta que alcanzan el estado de pupa, momento en que se producen drásticos cambios fisiológicos y morfológicos que culminan en la madurez sexual del individuo y un estado adulto totalmente activo.

Cada transición entre estadios va precedida por picos de liberación de ecdisona. Asimismo, que la larva mude o sufra metamorfosis viene determinado por el tiempo durante el cual se libera ecdisona y por la ausencia o presencia de la hormona juvenil (Riddiford, 1978; Berger y col., 1992; Talbot y col., 1993).

Existe una amplia variedad de cambios en el patrón de expresión génica asociados a la muda y la metamorfosis de los insectos. Todos ellos los coordinan y sincronizan hormonas ecdisoesteroideas como la ecdisona (Riddiford, 1993; Sekimoto y col., 2006). De forma resumida, como se refleja en la Figura 5, estos procesos se inician con la respuesta a un estímulo externo mediante la secreción de hormonas por parte de las células neurosecretoras del cerebro. Esta secreción estimula los cuerpos cardíacos, responsables de la secreción de la hormona protoracotrópica (PTTH, del inglés *Prothoracicotropic Hormone*), que a su vez estimula las glándulas protorácicas, las cuales se encargan de la síntesis y liberación de la hormona ecdisona. Esta hormona, que inicialmente es una molécula inactiva, se procesa en el cuerpo graso y los tejidos periféricos para dar lugar a su metabolito activo, la hormona 20-hidroxiecdisona (20E) (Gilbert y col., 2002).

La hormona 20-hidroxiecdisona se une a receptores nucleares (EcRs, del inglés *Ecdysone Receptors*), donde forma un heterodímero por la unión a la proteína ultraespiráculo (USP, del inglés *Ultraspiracle*), dando así lugar a la molécula funcional. El receptor hormonal, una vez activado por la hormona, actúa como un factor de transcripción que se une al promotor de los genes de respuesta hormonal, lo que constituye el inicio de la cascada de cambios en la expresión de numerosos genes responsables de la mayoría de las transformaciones que sufren los insectos en su desarrollo (Yao y col., 1992, 1993).

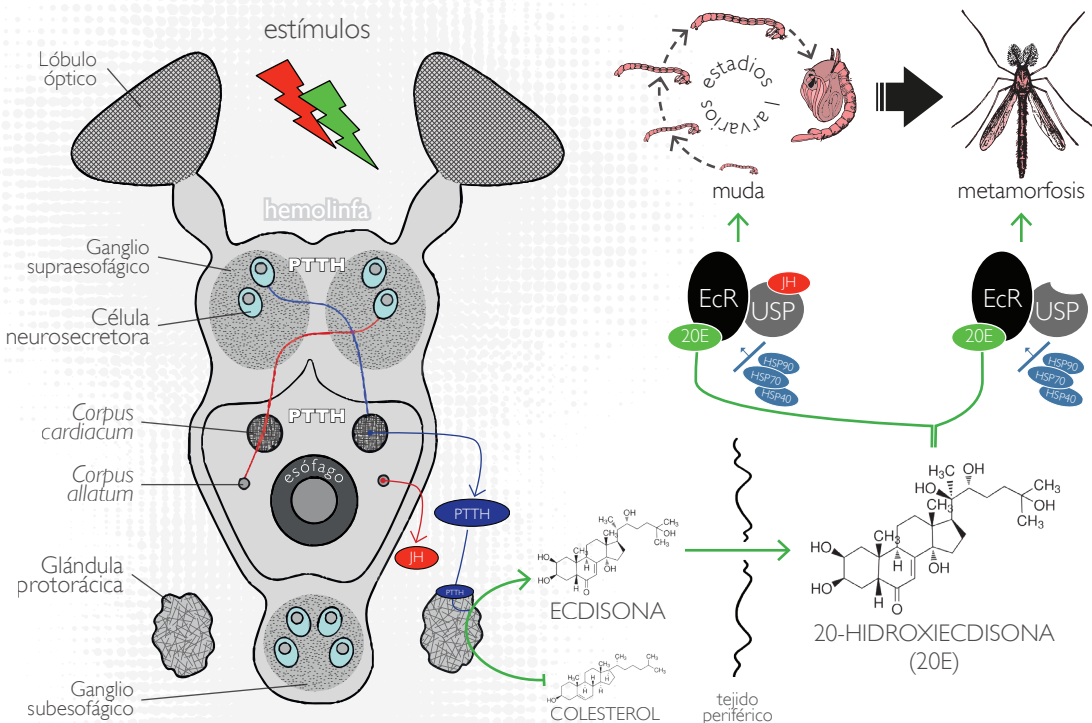


FIGURA 5. Esquema general de la producción de ecdisona y su papel en el desarrollo de insectos. Bajo determinados estímulos (fotoperiodo, temperatura, estado nutricional, etc.) las células neurosecretoras presentes en los ganglios cerebrales aumentan la síntesis de hormona protoracicotrópica (PTTH). PTTH es transportada a través de los axones de estas células hasta el par de glándulas endocrinas que conforman el *corpora cardiaca*, desde donde será liberada a la hemolinfa. Un segundo par de glándulas (*corpora allata*) se encarga de la secreción de la hormona juvenil (JH). Una vez en la hemolinfa, PTTH alcanza las glándulas protorácicas y activa la producción de ecdisona (E) a partir de moléculas de colesterol. La ecdisona se transforma en los tejidos periféricos en su metabolito activo 20E, que a su vez se une a su receptor específico (EcR) para desencadenar los procesos de muda (cuando simultáneamente se dan altos niveles de JH, que se une específicamente al USP) o metamorfosis (con bajos niveles de JH). El heterodímero EcR-USP puede ver alterada su funcionalidad debido a factores diversos, como por ejemplo modificaciones en la actividad de proteínas implicadas en el correcto plegamiento de sus dos componentes (HSP70, HSP40, HSP90). Imágenes modificadas de *Insect Life Cycles* (<http://cronodon.com>), Bio-DiTRL (<http://bio-ditrl.sunsite.ualberta.ca>) y Florida Center for Instructional Technology (<http://etc.usf.edu/clipart/>).

Para que se produzca la afinidad de este receptor por la hormona ecdisoesteroidea y la unión al ADN es imprescindible la unión de USP con EcR (Browning y col., 2007). USP actúa como un efector alostérico de EcR pero no contribuye a su función intrínseca. No tiene ligandos conocidos, aunque presenta un alto grado de homología a nivel de secuencia de aminoácidos con el receptor X retinoide (RXR, del inglés *Retinoid X Receptor*), presente en vertebrados. RXR pertenece también a la familia de los receptores hormonales nuclea-

res y forma heterodímeros con otros receptores como el receptor de la hormona tiroidea, el de la vitamina D3 o el del ácido retinoico (Mangelsdorf y col., 1995a; Mangelsdorf y Evans, 1995b). Por otro lado, contrariamente a lo que ocurre con EcR, los receptores de esteroides de vertebrados como el receptor de estrógenos (ER), el de progesterona (PR) o el de glucocorticoides (GR), actúan formando homodímeros en la respuesta a su respectivo ligando.

Además del EcR, cabe destacar los receptores relacionados con los estrógenos (ERRs, del inglés *Estrogen-Related Receptors*), un grupo de receptores nucleares que fueron identificados originalmente en base a la similitud de sus secuencias con la de ERs (Park y Kwak, 2010). La reconstrucción filogenética confirmó que ERR pertenece al subgrupo de receptores de hormonas esteroideas (Laudet, 1997), demostrando así su parecido estructural y funcional con ER, incluyendo su unión a ligandos estrogénicos sintéticos (Giguère, 2002). ERR y ER comparten características en cuanto a su afinidad por co-activadores y los lugares de unión al ADN, pero difieren de forma notable en lo relativo a su unión al ligando y su activación (Giguère, 2002).

Por todo lo expuesto, resulta evidente que los ecdisoesteroides son hormonas esteroideas que representan un papel importante en el desarrollo, crecimiento, muda de la larva y reproducción en *Chironomus* (Nair y Choi, 2012). El hecho de sufrir la metamorfosis bajo control hormonal hace de este organismo una valiosa herramienta para estudios ecotoxicológicos que tengan como finalidad conocer los efectos que la exposición a contaminantes pueda producir en su sistema endocrino (Zou y Fingerman, 1997; Mu y col., 2005; Rodríguez y col., 2007; Planelló y col., 2008), que es en definitiva regulador de etapas del desarrollo como la embriogénesis, el crecimiento, la metamorfosis y la reproducción (Watts y col., 2001). Asimismo, la similitud con la secuencia de cambios en los niveles de hormona y receptor en trabajos con *Drosophila melanogaster* y vertebrados (Syms y col., 1985; Deak y Laufer, 1995; Deak y col., 1998) permiten pensar en *Chironomus* como un buen modelo predictivo, de gran utilidad en evaluaciones del riesgo.

### 3.5. MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN

De entre los muchos mecanismos de detoxificación que se han descrito hasta la fecha, una capacidad importante adquirida por muchos seres vivos en el transcurso de la evolución es la de metabolizar los xenobióticos para facilitar su eliminación del organismo y prevenir sus posibles efectos tóxicos, proceso que recibe el nombre

de biotransformación. Este proceso persigue, a grandes rasgos, obtener sustancias hidrosolubles (fácilmente excretables) a partir de sustancias liposolubles (de difícil excreción) y consta de tres fases bien diferenciadas, denominadas Fase I, Fase II y Fase III (ver Figura 6).

En la Fase I de estos procesos se pueden encontrar reacciones químicas de distinta naturaleza cuyo resultado es la modificación química de las moléculas de los xenobióticos, dando lugar a la aparición de nuevos grupos funcionales. Entre estas reacciones se encuentran la oxidación, reducción, hidrólisis, hidratación, desalquilaciones y deshalogenaciones, siendo una de las más comunes la hidroxilación llevada a cabo por el sistema de oxidasas del citocromo P450, cuyo objetivo final es la generación de especies de oxígeno altamente reactivas. Si estos metabolitos son lo suficientemente polares, pueden ser fácilmente excretados en las heces a través de la bilis. Sin embargo, muchos productos de la Fase I no se eliminan rápidamente y experimentan alguna de las reacciones correspondientes a la Fase II.

Las reacciones de Fase II facilitan la conjugación de los xenobióticos, o de los metabolitos generados en la Fase I, con moléculas endógenas tales como el ácido glucurónico, glutatión, sulfatos o aminoácidos. Los productos de estas reacciones de conjugación tienen mayor peso molecular que sus metabolitos de origen, tienden a ser menos activos que aquellos y se excretan con mayor facilidad en la orina, la bilis o el sudor. Una de las reacciones más importantes es la conjugación con glutatión, catalizada por la enzima glutatión S-transferasa, cuyo objetivo es producir metabolitos solubles en agua que puedan ser fácilmente excretados a través de los riñones.

Tras las reacciones de Fase II algunos conjugados pueden ser nuevamente metabolizados en lo que sería la Fase III del proceso de detoxificación de xenobióticos, en la cual los conjugados y sus metabolitos pueden ser excretados de las células con sus grupos aniónicos actuando como dianas de afinidad para una amplia variedad de transportadores de membrana, entre los que se encuentran la P-glicoproteína y la familia de proteínas de resistencia a multidrogas (MRP, del inglés *Multidrug Resistance Protein*).

El citocromo P450 (CYP450) y la glutatión S-transferasa (GST), participantes respectivamente en la Fase I y la Fase II de los procesos de biotransformación, componen dos grandes grupos de enzimas detoxificadoras multifuncionales, responsables de metabolizar en los organismos una gran variedad de compuestos, tanto xenobióticos como endógenos (Cochrane y LeBlanc, 1986; Feyeresien, 1999; Scott y Wen, 2001; Yang y col., 2007; Gui y col., 2009).

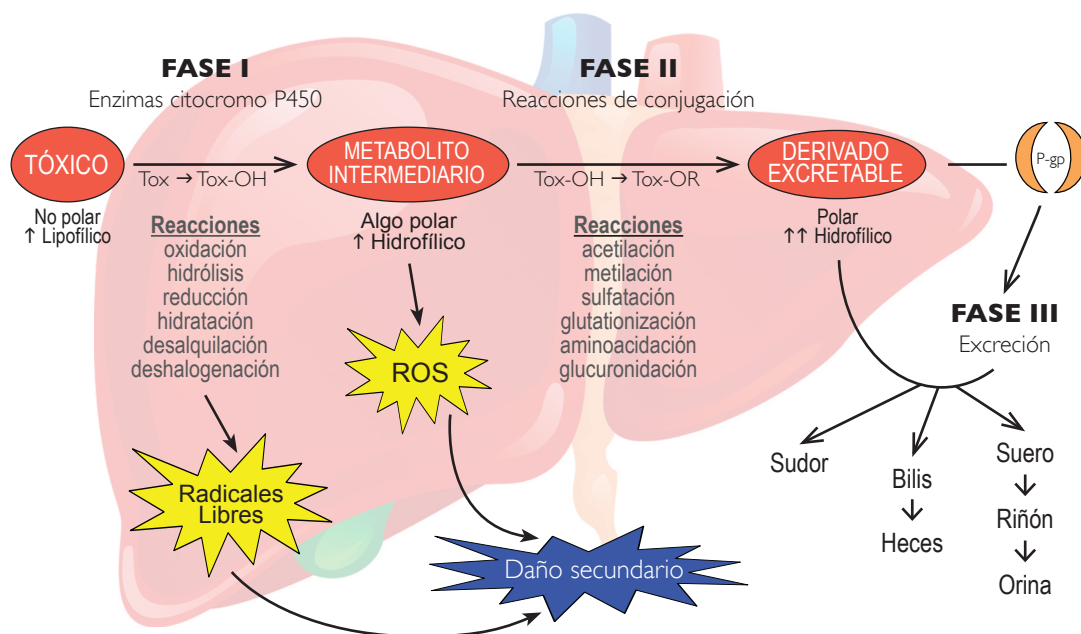


FIGURA 6. Esquema de las Fases I, II y III del metabolismo de detoxificación de xenobióticos. Enzimas de la familia del citocromo P450 biotransforman el tóxico en la Fase I, introduciendo oxígeno en su molécula para obtener así un metabolito reactivo. En este punto pueden producirse radicales libres, derivados de superóxidos provenientes de las distintas reacciones, así como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) procedentes de los metabolitos intermedios. Ambos productos podrían causar daños en tejidos secundarios, por lo que es importante la participación de sustancias antioxidantes y el paso rápido a la Fase II de los tóxicos que en este punto no hayan podido ser excretados. Las reacciones de conjugación de esta nueva fase dan como resultado compuestos menos activos (menos tóxicos) y más hidrosolubles (más fácilmente excretables). Estos conjugados pueden seguir alguna de las distintas vías de excreción (sudor; orina o heces) o bien ser nuevamente metabolizados y excretados posteriormente de las células, en lo que constituiría la Fase III de este proceso. Esta excreción se llevaría a cabo gracias a la intervención de distintos transportadores de membrana de la familia de las proteínas de resistencia a multidroga (MRPs), como la glicoproteína P (P-gp).

La familia del CYP450 es una de las familias génicas más prolíficas de entre las que han sido secuenciadas hasta la fecha, contando en insectos con seis miembros, cinco de ellos específicos de este grupo animal y el sexto también presente en vertebrados (Feyereisen, 1999). Su diversidad genética en insectos está bien documentada (Feyereisen, 2006), aunque son todavía un enigma los mecanismos para tan amplio repertorio de proteínas, su especialización funcional y por qué algunas son reclutadas para regular señales transduccionales mientras otras responden genéticamente a estímulos ambientales. En estos organismos está cada vez más claro el papel de estas enzimas en procesos fisiológicos básicos como la síntesis y degradación de señales hormonales endógenas



(Gilbert y Warren, 2005). El metabolismo de la ecdisona y la hormona juvenil está relacionado con la actividad del CYP450 (Kayser y col., 1997; Feyereisen, 1999; Guittard y col., 2011), aunque en la respuesta de genes concretos de esta familia deben existir interacciones entre la exposición a sustancias químicas y las funciones endocrinas (Le Groff y col., 2006).

Los citocromos son enzimas que están implicadas en numerosas reacciones químicas, entre las que destacan: hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, O-desalquilación, desaminación, N-oxidación y sulfoxidación. Poseen cierta permisividad en cuanto al sustrato sobre el que actúan, de manera que sus especificidades se solapan asegurando que virtualmente cualquier xenobiótico sea metabolizado por ellas. Por este motivo, el metabolismo oxidativo de señales endógenas, drogas y xenobióticos en general constituye la función celular principal de estas enzimas detoxificadoras (Lewis e Ito, 2008).

Distintos estudios sobre los procesos biológicos de toxificación y detoxificación han permitido proporcionar explicaciones sobre la toxicidad de muchas sustancias químicas. Así, el análisis de los niveles de proteína mediante técnicas catalíticas o inmunológicas ha resultado ser un método adecuado para supervisar los efectos de la contaminación desde un punto de vista molecular (Bolt y Ros, 2008). Además, se ha comprobado que la exposición a xenobióticos lleva a variaciones en los niveles de expresión de los genes de la familia CYP450 (Conney, 2003; Scott, 2008), habiéndose descrito este comportamiento también en *Chironomus riparius* (Martínez-Paz y col., 2012).

Aunque se han descrito numerosos componentes de esta familia en distintas especies de insectos, particularmente en dípteros, la información sobre estos genes en especies de quironómidos es todavía escasa. El gen *CYP4G* de *C. riparius* ha sido recientemente caracterizado y secuenciado en nuestro laboratorio (Martínez-Paz y col., 2012), por lo que se ha empleado como sonda en el presente trabajo. Los perfiles de expresión génica podrían ser una potente diana en estudios ecotoxicológicos (Snell y col., 2003), a la vez que ayudarían en la comprensión de los mecanismos moleculares de toxicidad y el modo de acción de los xenobióticos. Sin embargo, aún debe profundizarse en el conocimiento del patrón de respuesta de estas familias de genes y sus inductores para llegar a una comprensión completa del papel metabólico que desempeñan. De hecho, su enorme diversidad explica en gran medida las variaciones en la biotransformación y toxicidad de muchos xenobióticos frente a diferentes especies, e incluso entre distintos individuos (Brattsten, 1986; Scott, 1999; Repetto y Repetto, 2009).



La GST es una familia de enzimas ubicua en organismos aerobios que cataliza la conjugación del glutatión endógeno con una gran variedad de compuestos electrofílicos (Board y Menon, 2013), protegiendo las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con, por ejemplo, un insecticida. Estas enzimas están implicadas en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, incluidos varios carcinógenos y un número considerable de medicamentos, pero intervienen asimismo en el transporte intracelular, la biosíntesis de hormonas y la protección frente a estrés oxidativo (Enayati y col., 2005). La conjugación incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico, facilitando la excreción de la molécula del organismo (Board y Menon, 2013).

La GST citosólica es una enzima inducible por algunos compuestos químicos, tanto en mamíferos como en insectos (Mannervik y col., 1985). Además, en organismos acuáticos está implicada en procesos de biorremediación y en la protección de las células frente a epóxidos y especies reactivas de oxígeno (Creaney y col., 1995; Escartin y Porte, 1996; Tjalkens y col., 1998; Nair y Choi, 2011b).

Varios estudios han correlacionado la resistencia a insecticidas con niveles incrementados de actividad GST y la producción de diferentes isoformas (Hemingway y col., 1998; Ranson y Hemingway, 2005a; Che-Mendoza y col., 2009). Las diferentes actividades catalíticas de GST y el número de isoformas presentes en los grupos de insectos susceptibles y resistentes han demostrado ser los factores responsables de la resistencia a distintos insecticidas (Ranson y col., 2002; Ranson y Hemingway, 2005b).

Este sistema enzimático generalmente está involucrado en la resistencia a insecticidas organofosforados y proveen la forma más importante de resistencia metabólica al organoclorado DDT en insectos (Ranson, 2001). Participa también en la biotransformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, del inglés *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) y otros contaminantes orgánicos por parte de larvas de quironómidos (Yuen y Ho, 2001; Rakotondravelo y col., 2006; Park y col., 2010; Martínez-Paz y col., 2012).

Por último, las defensas contra especies reactivas de oxígeno, producidas por la exposición a xenobióticos o su metabolización, están conformadas por las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Concretamente, GPx protege a la célula del daño oxidativo gracias a su capacidad de degradar estas especies transformando el peróxido de hidrógeno libre en agua, al catalizar la reacción de oxidación del glutatión a glutatión disulfuro.

### 3.6. METABOLISMO ENERGÉTICO

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima clave que cataliza la conversión de gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato en el sexto paso de la glucólisis, proceso orientado a la ruptura de moléculas de glucosa para obtener con ello energía y poder reductor. Ha sido usada comúnmente como control interno en estudios de expresión génica y de proteínas, habiéndosele asignado la etiqueta de «gen constitutivo» o «de referencia» en este tipo de trabajos, debido en parte al escaso conocimiento de otras funciones no glucolíticas hasta mediados de los años 90 (Nicholls y col., 2012). En este sentido, a causa de que el gen que codifica para esta enzima es normalmente estable y se expresa de manera constitutiva y con altos niveles en la mayoría de tejidos y células, se le ha considerado tradicionalmente un buen gen de referencia en estudios de PCR semicuantitativa y cuantitativa, así como en trabajos con Real Time PCR (Carnahan y col., 2013; Sirakov y col., 2013).

En los últimos años se han descrito distintas funciones de GAPDH en múltiples compartimentos subcelulares: citoplasma, retículo, mitocondria y núcleo (ver Figura 7). En el citoplasma, además de su consabida participación en la glucólisis, esta enzima colabora en la regulación del estado de oxidación/reducción de la célula mediante la redirección del flujo de carbohidratos entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato, tras una S-tiolación (-SSG) que ha sido propuesta como un mecanismo de defensa celular ante un daño oxidativo (Grant y col., 1999). Cuando el daño oxidativo es elevado pueden llegarse a producir agregados de GAPDH que en última instancia desencadenen la muerte celular (Tristan y col., 2011). Además, recientemente se ha implicado a esta enzima en procesos no metabólicos como el transporte de vesículas desde el retículo al Golgi (Tisdale y Artalejo, 2007) y su asociación con componentes del citoesqueleto como la actina y la tubulina (Tristan y col., 2011).

El estrés oxidativo también puede conducir a una S-nitrosilación (-SNO) reversible de GAPDH, que facilitaría su unión a la proteína Siah y la posterior traslocación de este complejo al núcleo, pudiendo en este caso desencadenar procesos apoptóticos o alteraciones de la función celular (Nicholls y col., 2012). También en el núcleo, puede producirse una regulación de la muerte celular tras la unión de GAPDH con la proteína de la leucemia promielocítica (PML, del inglés *Promyelocytic Leukemia*). Como contrapartida, GAPDH participa también en distintas asociaciones proteicas que favorecen el buen estado de salud de la célula mediante procesos como la reparación y transcripción del ADN (Zheng y col., 2003), la regulación del ciclo celular (Mansur y col., 1993; Carujo y col., 2006) y la unión a los telómeros con la finalidad de protegerlos (Sundadaraj y col., 2004).

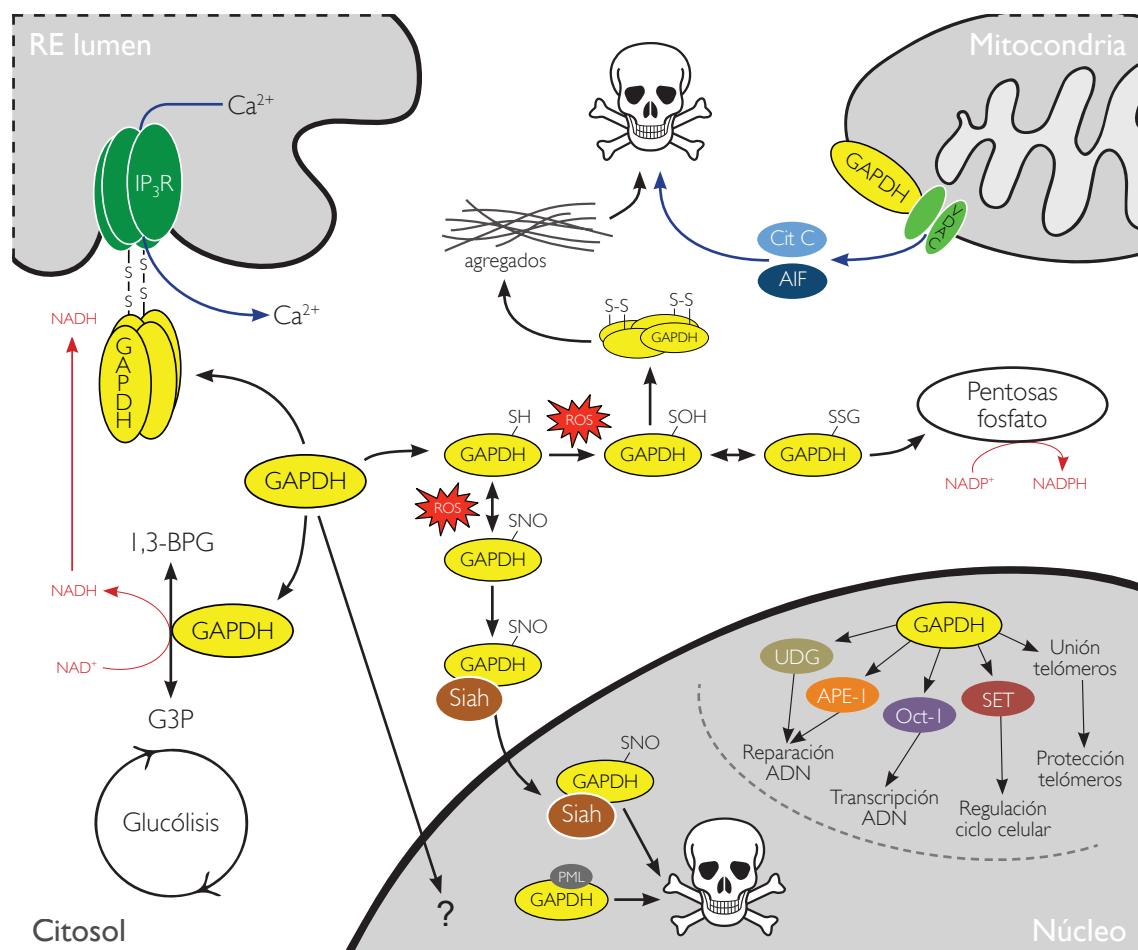


FIGURA 7. Algunas de las funciones más relevantes de la enzima GAPDH. Participa directamente en la obtención de energía mediante su intervención en el sexto paso de la glucólisis. Bajo condiciones de estrés oxidativo (ROS) puede sufrir modificaciones postraduccionales con distintas repercusiones en su actividad. Por un lado, su S-tiolación (-SSG) le permite participar en la redirección del flujo de carbohidratos de la glucólisis a la ruta de las pentosas fosfato, jugando así un papel protector de las células frente al estrés. Este papel se ve acentuado con su intervención en la regulación del  $Ca^{2+}$  intracelular mediante su unión al canal que IP<sub>3</sub>R forma en la membrana del retículo. La exposición a oxidantes puede llevar también a la formación de agregados citosólicos que conduzcan a la disfunción y/o muerte celular; así como a su S-nitrosilación (-SNO), que facilitaría su unión a la proteína Siah y posterior entrada en el núcleo, llevando en último término a la disfunción celular y/o la muerte por apoptosis. Los eventos apoptóticos se ven también inducidos, esta vez por la vía mitocondrial, a causa de la asociación de GAPDH con el canal iónico dependiente de voltaje (VDAC), que ocasiona la pérdida del potencial transmembrana, la tumefacción y permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación al citosol de citocromo C (Cit C) y del factor de inducción de apoptosis (AIF), dos proteínas proapoptóticas. GAPDH también participa en la reparación y transcripción del ADN, la regulación del ciclo celular y la protección de los telómeros mediante su asociación con diversas proteínas nucleares. Modificado de Patterson y col. (2005) y Tristan y col. (2011).

Además de en los procesos apoptóticos desencadenados en el núcleo, GAPDH también puede inducir este tipo de muerte celular a través de la vía mitocondrial, a causa de su asociación en la membrana de este orgánulo con el canal iónico dependiente de voltaje (VDAC) y, como consecuencia, la posterior pérdida del potencial transmembrana, la tumefacción y permeabilización de la membrana y finalmente la liberación de proteínas proapoptóticas como citocromo C (Cit C) y el factor de inducción de la apoptosis (AIF) (Tarze y col., 2007).

Por último, se ha descrito también la capacidad de GAPDH de modular la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, en este caso gracias a su unión con el receptor del inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) en la membrana del retículo y la liberación de NADH en las proximidades de este canal (Patterson y col., 2005).

Dada la gran variedad de papeles desempeñados por la enzima GAPDH, su implicación en rutas tanto metabólicas como fisiológicas y puesto que distintos autores ya han constatado la regulación de este gen bajo condiciones específicas (Shen y col., 2010; Wang y Xu, 2010), su uso para la normalización de resultados de expresión ha de ser considerado cuidadosamente en cada caso.

### **3.7. COMPORTAMIENTO DE POBLACIONES NATURALES: ESTUDIOS DE CAMPO**

Se puede considerar que no existe en todo nuestro planeta un ecosistema exento de trazas de actividad antropogénica. Agentes contaminantes se localizan incluso en zonas alejadas de toda colonización humana, aportados por los movimientos de las masas de aire, las corrientes marinas u oceánicas o los más diversos fenómenos atmosféricos (Hermoso de Mendoza, 2008). Desgraciadamente, la capacidad que tenemos de contaminar no va acompañada del conocimiento y la capacidad de predecir los peligros potenciales para la salud, siendo por tanto de suma importancia disponer de una metodología que nos permita evaluar el estado toxicológico de los ecosistemas.

Ya a mediados del siglo pasado se puso de manifiesto la necesidad de proteger el medio ambiente, en especial a causa de los posibles efectos tóxicos que en poblaciones naturales podían producir las emisiones de sustancias químicas en los ecosistemas, producidas principalmente por las actividades humanas. La Ecotoxicología, por tanto, se desarrolló con el objetivo de proporcionar respuestas a estos problemas crecientes, incluso a partir de información relativamente escasa.

La Ecotoxicología tradicional ha pretendido paliar esta falta de información mediante la valoración o cuantificación de la concentración de los contaminantes en el medio ambiente a través de sus distintos compartimentos: aire, agua y suelo. No obstante, esta cuantificación por sí sola no permite evaluar los efectos concretos de los agentes potencialmente contaminantes sobre los organismos vivos, pues generalmente excluye del estudio factores tales como la biotransformación, la biodisponibilidad de la sustancia o la especiación del xenobiótico, determinantes todos ellos de la toxicidad de una sustancia en dichos organismos (Henderson y col., 1989).

En las últimas décadas, la evaluación del riesgo ecológico (ERA, del inglés *Environmental Risk Assessment*) se ha venido basando en instrumentos simplificados, a fin de proporcionar métodos experimentales adecuados en apoyo de las distintas regulaciones sobre sustancias químicas. Esto ha dado lugar a multitud de métodos sencillos, aplicables incluso con la escasa información disponible, y ha permitido el desarrollo de muchas directivas y regulaciones europeas, como las de pesticidas y biocidas, cosméticos y el REACH, entre otras.

Según Van Straalen (2003), la regulación relativa a sustancias químicas ha cambiado sustancialmente los problemas medioambientales y de contaminación en los países desarrollados desde mediados del siglo pasado. En este tiempo ha mejorado la calidad de los ecosistemas y los efectos agudos, como los observados en el pasado, son ahora eventos excepcionales relacionados con vertidos accidentales, al menos en los ecosistemas de aguas superficiales. Sin embargo, el problema de la contaminación ambiental está lejos de ser resuelto y los efectos de los factores de estrés antropogénico son todavía capaces de producir graves daños a los ecosistemas. Es por ello que el objetivo de la protección del medio ambiente (y de la evaluación de riesgo ecológico) se dirige a proteger la estructura y las funciones de las comunidades biológicas naturales y ecosistemas (EEC, 1994).

A pesar de su gran utilidad práctica, las herramientas tradicionales que se han usado de manera generalizada en la ERA para evaluar los efectos de las sustancias químicas, basadas principalmente en ensayos toxicológicos de laboratorio, adolecen de falta de realismo ecológico. Tienen además una escasa capacidad de describir y predecir las consecuencias reales sobre la estructura y las funciones de los ecosistemas naturales. Y las mismas observaciones pueden hacerse sobre la evaluación de la exposición, basada generalmente en modelos simples aplicados a escenarios más o menos estandarizados, poco representativos de la complejidad y la variabilidad de las condiciones ambientales actuales.

Como consecuencia, existe una necesidad creciente de métodos capaces de responder a preguntas más complejas que las relaciones dosis/concentración-respuesta. Esto es esencial para mejorar la capacidad de predicción de la Ecología y la Ecotoxicología, para describir los efectos al nivel jerárquico de las comunidades, para aumentar el realismo ecológico de evaluación de riesgo ecológico y para describir mejor las consecuencias reales para los ecosistemas naturales.

Para mitigar en parte estas limitaciones, la Ecotoxicología ha recurrido al seguimiento de los efectos cualitativos y/o cuantitativos causados por los agentes químicos en los organismos vivos (Lagadic, 2002). Este proceso, denominado biomonitorización, proporciona información acerca de las relaciones entre las condiciones ambientales y los seres vivos (Moreno, 2003) incluyendo distintos componentes (Burger, 1997; Burger y Gochfeld, 2001), como el análisis de las concentraciones del agente químico en tejidos del organismo bioindicador, la valoración de la salud potencial y los efectos en las poblaciones estudiadas y en sus depredadores, la evaluación de las interferencias con los niveles tisulares o efectos observables en las presas y el estudio de la tendencia espacial o temporal de los niveles de contaminantes.

Una de las nuevas herramientas de trabajo requeridas en los programas de biomonitorización son los bioindicadores, organismos vivos que por sus características ecológicas presentan una elevada sensibilidad a los cambios ambientales, reaccionando ante ellos como si fueran estímulos específicos (Capó, 2002), y cuya acumulación de contaminantes traza se manifiesta mucho antes que en muestras abióticas (Spanh y Sherry, 1999). En definitiva, la monitorización se presenta como la base para poder desarrollar programas de control y gestión medioambiental efectivos.

En base a estos planteamientos, se decidió analizar en el presente trabajo el efecto de DEHP y BBP sobre larvas procedentes de poblaciones naturales de *C. riparius*. Así, teniendo en cuenta que la constante exposición de estas larvas a mezclas de sustancias químicas en sus ecosistemas puede condicionar su respuesta tóxica, se estudió la diferencia de efectos con respecto a las larvas de laboratorio.

# OBJETIVOS



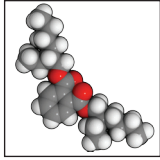
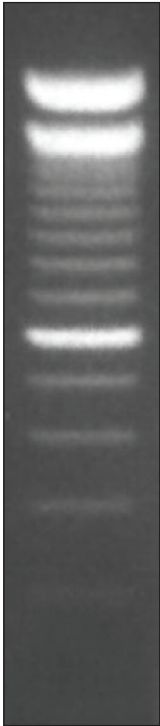


El trabajo de esta tesis doctoral se plantea como una primera aproximación al estudio *in vivo* de los efectos citotóxicos de dos ftalatos, el DEHP y el BBP, contaminantes presentes en multitud de ecosistemas, especialmente los acuáticos. El estudio se orienta a la identificación de biomarcadores celulares y moleculares tempranos de toxicidad acuática, que puedan ser utilizados en la evaluación del daño que estos compuestos ejercen sobre organismos invertebrados. El organismo utilizado es *Chironomus riparius*, considerado como modelo en ensayos de toxicidad en ecosistemas acuáticos. Los estudios se centraron en las larvas acuáticas del cuarto estadio.

Los objetivos concretos que se pretenden alcanzar son:

- Determinar los cambios que por el efecto del DEHP y del BBP se producen en las larvas a nivel celular y molecular, así como evaluar la existencia de efectos específicos de cada compuesto y/o comunes a ambos.
- Analizar la posible relación entre la respuesta de estrés celular y la toxicidad inducida por estos compuestos.
- Establecer la posible actividad de ambas sustancias como disruptores endocrinos en invertebrados, analizando parámetros directamente implicados con la ruta hormonal de la ecdisona.
- Analizar los efectos que DEHP y BBP puedan tener sobre rutas metabólicas relacionadas con procesos de obtención de energía, como es el caso de la glucólisis.
- Valorar la capacidad detoxificadora de las larvas de *Chironomus riparius* en presencia de estos compuestos, a través de parámetros relacionados con el proceso de biotransformación de xenobióticos.
- Analizar la sensibilidad a estos ftalatos en poblaciones naturales.





# MATERIAL & MÉTODOS



## MATERIAL

### I. ORGANISMO DE ENSAYO

Todos los estudios realizados en este trabajo se han llevado a cabo con larvas de estadio IV de *Chironomus riparius* (Meigen), organismo de referencia en toxicología acuática empleado extensivamente en la valoración de la toxicidad de sedimentos y recogido a tal efecto en múltiples normativas internacionales (Leppänen y col., 2006). Como se detalla más adelante, dichas larvas proceden tanto de cultivos mantenidos en nuestro laboratorio como de poblaciones naturales.

#### I.1. CULTIVOS DE LABORATORIO

Para llevar a cabo los estudios de toxicidad se emplearon larvas de estadio IV de *C. riparius* cultivadas en nuestro laboratorio. El cultivo procede originariamente de poblaciones naturales de este insecto en Massamagrell (Valencia, España; 39°34'1.43"N 0°19'58.94"O), cuya localización geográfica aparece reflejada en la Figura 8.

Los cultivos de laboratorio siguen las directrices de los protocolos estandarizados para ensayos de toxicidad (EPA, 2000; OECD, 2004; ASTM, 2010). Se mantienen en una cámara a temperatura constante de 18 °C y con periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas, lo que permite una regularidad en su crecimiento y desarrollo.

Las puestas fueron recogidas e implantadas individualmente en cubetas de plástico conteniendo medio salino ( $\text{CaCl}_2$  0.5 mM, NaCl 1 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  0.1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.025 mM,  $\text{FeCl}_3$  0.01 mM) y con aireación constante. Las larvas se alimentaron dos veces por semana con hojas secas molidas de ortiga y comida comercial de peces de acuario (TetraMin®). Además, al cultivo se le añade una pequeña cantidad de papel de celulosa, necesaria para la construcción de los tubos donde los quironómidos atraviesan por los distintos estadios larvarios.

La recolección de los individuos para los estudios de toxicidad se llevó a cabo mezclando, para cada experimento, larvas procedentes de al menos tres cubetas de cultivo distintas, para asegurar la variabilidad genética de la muestra y la obtención de resultados más representativos de la realidad.



FIGURA 8. Localización geográfica de la zona de muestreo de las larvas de *C. riparius* que dieron origen a los cultivos de laboratorio con los que se ha llevado a cabo la experimentación en este trabajo. Massamagrell, Valencia, España (39°34'1.43"N 0°19'58.94"O).

## I.2. POBLACIONES NATURALES

Para el estudio de los posibles efectos tóxicos de los ftalatos en larvas de poblaciones naturales, se seleccionó un tramo del río Sar a su paso por la localidad de Bertamirás (A Coruña, España; 42°51'22.99"N 8°38'53.58"O), tal y como se localiza en la Figura 9. La zona en la que fueron recogidas las muestras se encuentra a 19 km del



nacimiento del río y engloba aproximadamente 100 metros de rivera a ambos lados del puente de la carretera que enlaza Bertamirás con A Condomiña, que pasa sobre el río (ver Figura 10).

Este tramo del río Sar se caracteriza por un enriquecimiento orgánico notable (Díaz-Fierros, 2000), lo que junto con los aceptables niveles de oxigenación detectados facilita la presencia de larvas de quironómidos durante prácticamente todo el año.



FIGURA 9. Localización geográfica de la zona de muestreo de las larvas de *C. riparius* empleadas en la experimentación de campo llevada a cabo en este trabajo. Bertamirás, A Coruña, España (42°51'22.99"N 8°38'53.58"O).

La recolección se llevó a cabo con una pequeña red de mano de 15 cm de diámetro, 20 cm de profundidad y 250  $\mu\text{m}$  de luz de malla. A continuación se procedió a la separación y lavado de los individuos, empleando para ello un tamiz de 250  $\mu\text{m}$  de luz de malla (ver Figura 10).



FIGURA 10. Distintos momentos en el desarrollo de los trabajos de campo. Tras la localización del área de muestreo (imagen superior), se procedió a la recolección de todo el material de estudio, tanto las larvas de *Chironomus riparius* (imagen inferior izquierda), como las muestras de agua y sedimento de los puntos donde se recogieron éstas. Se tomaron además medidas de la temperatura, el pH, la conductividad y la turbidez del agua en dichos puntos. Las larvas se mantuvieron con aireación constante en el laboratorio de la Estación de Hidrobiología 'Encoro do Con' (EHEC) hasta la selección de los individuos necesarios para llevar a cabo los estudios de toxicidad con los ftalatos (imagen inferior derecha).

Se recolectaron larvas de estadio IV de *C. riparius* de forma selectiva en el mes de octubre de 2011, escogiendo los microhábitats más adecuados para estos animales (lugares con una velocidad de corriente muy baja, sedimento fino y acumulación de materia orgánica sobre éste). Para asegurar la heterogeneidad de la muestra, durante el muestreo se cubrió un tramo de río de unos 200 metros, seleccionado a lo largo de esta longitud cuatro puntos para la recolección de larvas. En dichos puntos se tomaron asimismo muestras de sedimento y agua y se llevaron a cabo las medidas de distintos parámetros



físico-químicos: temperatura, pH, conductividad, turbidez (sonda multiparamétrica Cri-son MM-40) y oxígeno disuelto (oxímetro YSI 550A).

Para su traslado al laboratorio de la Estación de Hidrobiología 'Encoro do Con' (EHEC), de la Universidad de Santiago de Compostela, se emplearon cubos de plástico con cierre hermético y capacidad para 5 litros, en el caso de las larvas y el sedimento, y botellas de vidrio opaco de un litro de capacidad, para las muestras de agua. Todos los recipientes se etiquetaron convenientemente en el mismo momento del muestreo. La duración máxima del traslado de las muestras nunca sobrepasó los 45 minutos y durante este tiempo éstas se mantuvieron a 15 °C y preservadas de la luz.

En el caso de las larvas, cada cubo se rellenó en el momento del muestreo con agua del propio río Sar hasta un volumen de aproximadamente las tres cuartas partes de su capacidad máxima, con objeto de minimizar el impacto del transporte sobre las larvas. Una vez en el laboratorio de la EHEC, el contenido de los cubos fue mezclado y distribuido en cubetas y las muestras se mantuvieron con aireación constante durante el tiempo necesario para la recolección de los individuos seleccionados para los estudios de toxicidad (ver Figura 10). La determinación taxonómica de la especie *C. riparius* y del estadio larvario se llevaron a cabo en base a la clasificación establecida por Wülker & Götz (1968). Los individuos de estudio fueron separados en viales en grupos de 5 larvas y congelados a -80 °C. Para su posterior uso en nuestro laboratorio de la Facultad de Ciencias de la UNED, las muestras fueron trasladadas en nieve carbónica.

Las muestras de sedimento y agua se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. El análisis químico de las sustancias presentes en las mismas se llevó a cabo en el Departamento de Analítica de la Universidad de A Coruña y consistió en la determinación cuantitativa de una batería de pesticidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs, del inglés *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), metales pesados y fragancias, así como en un análisis cualitativo de sustancias (presencia o ausencia) cuyas concentraciones se encontraban por debajo de los límites de cuantificación (ver Anexo I).

El análisis de los pesticidas se realizó mediante extracción líquido-líquido, empleando cromatografía líquido-sólido para la purificación de los extractos y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Thermo Finnigan Polaris Q) para su detección. Las concentraciones de PPCPs en las muestras de sedimento se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC/MS) (Applied Biosystem API 3200 y Thermo LTQ Orbitrap), tras la extracción ultrasónica del solvente.

## 2. COMPUESTOS QUÍMICOS

La investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral se desarrolló sobre dos compuestos que cumplieran con los siguientes criterios de selección:

- Marcado carácter tóxico. Compuestos sobre los que se conocían efectos adversos en distintos modelos toxicológicos y ecotoxicológicos, especialmente los relacionados con el desarrollo.
- Posible acción como disruptor endocrino. Compuestos sobre los que se había descrito previamente cierto grado de actividad disruptora, especialmente en vertebrados.
- Presencia persistente en ecosistemas acuáticos. Compuestos cuya presencia en ecosistemas acuáticos era habitual y que por sus características físico-químicas se conocía su tendencia a depositarse y acumularse en los sedimentos, hábitat preferente de nuestro organismo de estudio.

Los dos compuestos químicos evaluados, el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP; Fluka, EE.UU.) y el butil bencil ftalato (BBP; Fluka, EE.UU.), pertenecen al grupo de los ftalatos. Se trata de aditivos muy utilizados en plásticos y otros materiales y que en la actualidad conforman un nutrido grupo de contaminantes ubicuos. Estos ésteres del ácido ftálico se emplean principalmente como plastificantes en la industria del policloruro de vinilo (PVC). Dado que no se encuentran químicamente unidos al plástico, pueden desprenderse con relativa facilidad de los productos finales. Este hecho, junto con su uso generalizado a nivel mundial y sus potenciales efectos adversos sobre la salud humana, ha generado una creciente preocupación pública en los últimos años.

Las características principales del DEHP y el BBP se han detallado previamente en este trabajo, así como la información más relevante relativa a sus perfiles toxicológicos.

## 3. REACTIVOS Y ENZIMAS

Las sales, ácidos, bases inorgánicas y compuestos orgánicos empleados en la elaboración del medio de cultivo de los mosquitos, así como del resto de reactivos empleados para las soluciones, proceden de las principales casas comerciales.

Algunos de los reactivos y enzimas más utilizados, así como su marca o casa comercial, aparecen listados en la Tabla 8.

Reactivo	Marca
ADNasa libre de ARNasa	Roche (Basel, Suiza)
ARNasa H	Invitrogen™ (Alcobendas, Madrid, España)
Blocking Reagent	Roche (Basel, Suiza)
BSA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific (Hudson, New Hampshire, EE.UU.)
Columnas Phase Lock Gel	5 PRIME (Hamburg, Alemania)
Desoxioligonucleótidos	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit	Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
High Retrotranscriptase	Bitools (Madrid, España)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
Isopropanol	Panreac (Barcelona, España)
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen™ (Alcobendas, Madrid, España)
Pirocarbonato de dietilo (DEPC)	Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.)
ProLong® Gold Antifade Reagent	Invitrogen™ (Alcobendas, Madrid, España)
Reactivos para geles de poliacrilamida	Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.)
Reactivos para PCR	Bitools (Madrid, España)
RNasin® RNase inhibitor	Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.)
SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen™ (Alcobendas, Madrid, España)
TRIzol® Reagent	Invitrogen™ (Alcobendas, Madrid, España)

TABLA 8. Principales reactivos y enzimas empleados en este trabajo.

## 4. OLIGONUCLEÓTIDOS

La mayoría de los desoxioligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de los genes de estudio fueron diseñados específicamente en nuestro laboratorio y sintetizados por Sigma-Aldrich.

En la Tabla 9 se detallan las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las amplificaciones de ADN, para el estudio a nivel molecular de los efectos tóxicos del DEHP y del BBP. Se especifican asimismo las longitudes de los fragmentos obtenidos y las referencias bibliográficas, en el caso de que dichas secuencias hayan sido publicadas con previamente.

Gen	Referencia	Cebadores	Longitud
<i>act</i>	Martínez-Guitarte y col., 2007	<b>F</b>   GATGAAGATCCTCACCGAACG <b>R</b>   CGGAAACGTTCAATTACCG	201 pb
<i>26S</i>	Gorab y col., 1995 Planelló y col., 2011	<b>F</b>   TTCGCGACCTCAACTCATGT <b>R</b>   CCGCATTCAAGCTGGACTTA	220 pb
<i>ITS2</i>	Planelló y col., 2011	<b>F</b>   TCATCAAAGCCGTTGTCT <b>R</b>   AATCGAATTGCAAACACC	248 pb
<i>rpl4</i>	Cedidos por Yoshimi (datos no publicados)	<b>F</b>   AACGCTTCAGAGCTGGACGTGG <b>R</b>   ATTCATCTTGTGTACGCTCATTG	149 pb
<i>rpl11</i>	Martínez-Guitarte y col., 2007	<b>F</b>   AGATCCCGTAAGCTTTGCC <b>R</b>   CATACTTCTGTTGGAACC	465 pb
<i>rpl13</i>	Martínez-Guitarte y col., 2007	<b>F</b>   AAGCTGCTTTCCCAAGAC <b>R</b>   TTGGCATAATTGGTCCAG	351 pb
<i>hsc70</i>	Planelló y col., 2010	<b>F</b>   CGTGCTATGACTAAGGACAA <b>R</b>   GCTTCATTGACCATACGTTT	239 pb
<i>hsp70</i>	Martínez-Guitarte y col., 2007 Morales y col., 2011	<b>F</b>   CATGTGAACGAGCCAAGAGA <b>R</b>   TTGCCACAGAAGAAATCTTG	274 pb
<i>hsp40</i>	Planelló y col., 2010	<b>F</b>   TACGTGACGCTAGAGGAAA <b>R</b>   TTCCAGCCCGGCTT	131 pb
<i>hsp27</i>	Datos no publicados	<b>F</b>   TCCTCGTGCTTGCC <b>R</b>   CAAGGATGGCTTCCA	202 pb
<i>hsp10</i>	Datos no publicados	<b>F</b>   GAGGAATTGTGATTCCAGA <b>R</b>   TGCCACCGTATTCAGG	151 pb
<i>EcR</i>	Planelló y col., 2008	<b>F</b>   AGACGGTTATGAACAGCC <b>R</b>   CGAGCCATGCGCAACATC	240 pb
<i>usp</i>	Planelló y col., 2010	<b>F</b>   CCGCCCAATCATCC <b>R</b>   CTGTGCGTTTGAAGAATCC	121 pb
<i>ERR</i>	Park K y Kwak IS, 2010	<b>F</b>   CTCAGCAAGTAAGGAGGAG <b>R</b>   CGTCTAATAATGTGATCGG	222 pb
<i>GAPDH</i>	Park K y Kwak IS, 2009	<b>F</b>   GGTATTTCAATTGAATGATCACTTTG <b>R</b>   TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	110 pb
<i>Cyp450</i>	Martínez-Paz y col., 2012	<b>F</b>   GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG <b>R</b>   TAAGTGGAAGTGGTGGGTACAT	340 pb
<i>GPx</i>	Nair y col., 2012	<b>F</b>   AAGTGTGGTTACACAGCTAAGCATT <b>R</b>   GATATCCAAATTGATTACACGGAAA	112 pb

TABLA 9. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Se detallan los genes de estudio, indicando los que se han amplificado por Real Time PCR (RT), el origen de las secuencias, los cebadores directo (F) e inverso (R) para cada uno de ellos y las longitudes en pares de bases (pb) de los fragmentos que se amplifican.

Gen	Referencia	Cebadores	Longitud
<i>EcR</i> (RT)	Datos no publicados	<b>F</b>   CCATCGTCATCTTCTCAG <b>R</b>   TGCCCATTTGTTCTAG	180 pb
<i>usp</i> (RT)	Datos no publicados	<b>F</b>   GCCCAATCATCCGTTAAGTGG <b>R</b>   CGTTTGAAGAATCCTTTACATCC	114 pb
<i>Hsp70</i> (RT)	Morales y col., 2011	<b>F</b>   ACTTGAACCAGTTGAGCGT <b>R</b>   TTGCCACAGAAGAAATCTTG	132 pb

TABLA 9. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Se detallan los genes de estudio, indicando los que se han amplificado por RealTime PCR (RT), el origen de las secuencias, los cebadores directo (F) e inverso (R) para cada uno de ellos y las longitudes en pares de bases (pb) de los fragmentos que se amplifican.

## MÉTODOS

### 5. SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ESTUDIO

La evaluación del riesgo medioambiental de cualquier sustancia se basa en comparar el peligro potencial de la misma con el nivel de exposición esperado en el medio. Para ello, han de tenerse en cuenta dos parámetros:

- PEC (del inglés *Predicted Environmental Concentration*). Estimación de la exposición o cálculo de la concentración de la sustancia en el medio ambiente.
- PNEC. Evaluación de los efectos o cálculo de la concentración umbral sin efectos adversos para los grupos de organismos previamente seleccionados, representativos del medio.

La cuantificación del riesgo se lleva a cabo en base a la relación PEC/PNEC, de forma que siempre que la exposición a una sustancia sea superior a la concentración sin efecto ( $PEC/PNEC > 1$ ), se identifica un riesgo medioambiental. Las evaluaciones de riesgo más recientes llevadas a cabo por la Unión Europea para DEHP y BBP (ECB, 2007, 2008) establecen en general ratios por debajo de uno para todos

los escenarios posibles (agua, atmósfera, suelo), haciendo hincapié en la baja solubilidad del DEHP en agua y en la necesidad de llevar a cabo estudios de disrupción endocrina en el caso del BBP.

Las distintas concentraciones de DEHP y BBP empleadas en este trabajo se prepararon a partir de soluciones *stock* de cada uno de los compuestos en etanol absoluto (Panreac, España),  $10^7$  y  $10^6$   $\mu\text{g l}^{-1}$  respectivamente.

Las soluciones *stock* se conservaron en nevera a 4 °C. A partir de ellas y en fresco para cada ensayo se prepararon las diluciones seriadas de estudio de ambos compuestos en etanol absoluto y medio de cultivo salino, manteniendo constante un porcentaje de etanol del 1% en el volumen final del cultivo para todas las concentraciones.

El rango final de concentraciones al que fueron expuestas las larvas en los ensayos abarcó nueve órdenes de magnitud y se mantuvo entre  $10^{-3}$  y  $10^5$   $\mu\text{g l}^{-1}$ , empleándose unas concentraciones u otras en función de los distintos estudios, tal y como se especifica más adelante. Estas concentraciones se encuentran tanto por encima como por debajo de los límites detectados en el medio ambiente, especialmente en lo que respecta a medios acuáticos.

## 6. ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Las larvas seleccionadas para los experimentos fueron expuestas a distintas concentraciones de DEHP y BBP (tratamientos) en vasos de cristal con un volumen final de 50 ml de medio de cultivo, siguiendo el procedimiento esquematizado en la Figura 11. Se emplearon 20 larvas por tratamiento. Durante estas exposiciones se mantuvieron las condiciones normales del cultivo (20 °C y un periodo de luz/oscuridad de 18/6 horas), no se renovó el medio de cultivo y no se alimentó a las larvas.

Como control de cada experimento se emplearon larvas mantenidas en medio de cultivo con un porcentaje de etanol igual que el contenido en los vasos con los tratamientos. Previamente, como control interno del laboratorio, se comprobó la ausencia de diferencias entre estos controles con etanol y controles sin etanol en los diferentes parámetros estudiados.

Para evitar sesgos en los resultados y asegurar la fiabilidad y representatividad de la muestra de larvas, se realizaron al menos tres experimentos independientes diferentes y espaciados temporalmente para cada concentración de compuesto analizada.

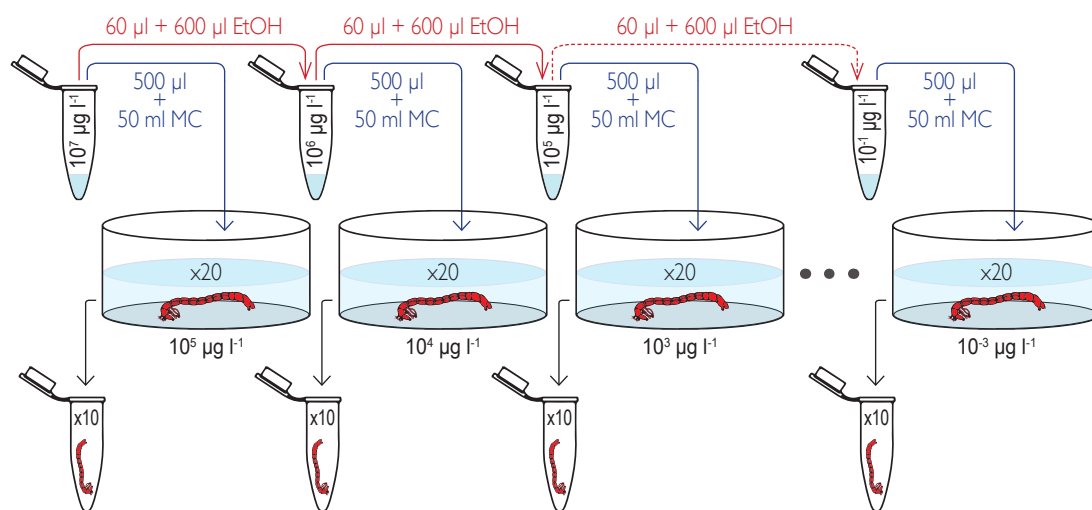


FIGURA 11. Protocolo experimental seguido en los estudios de toxicidad. Para cada uno de los compuestos y tiempos estudiados, se prepararon diluciones seriadas en etanol absoluto (EtOH) a partir de una solución madre del compuesto. El medio para cada tratamiento se preparó añadiendo a 50 ml de medio de cultivo fresco (MC) 500  $\mu\text{l}$  de la concentración de droga correspondiente, manteniéndose para todos los casos una concentración constante de etanol del 1%. En cada tratamiento se emplearon 20 larvas de estadio IV de *C. riparius*, 10 de las cuales fueron recogidas vivas una vez finalizado el tratamiento y congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  para su posterior empleo en los estudios moleculares.

## 6.1. TOXICIDAD AGUDA

Los estudios de toxicidad aguda tuvieron como finalidad detectar los efectos producidos por los compuestos de estudio tras una única administración. Se llevaron a cabo exponiendo las larvas a las distintas concentraciones de DEHP y BBP durante 24, 48, 72 ó 96 horas, según el compuesto.

Transcurrido el tiempo de exposición, se analizó en primer lugar la supervivencia de las larvas, considerándose muertas las que tras el tratamiento habían perdido la coloración y en las que además no se apreciaba movilidad alguna, ni siquiera tras su estimulación. Una vez realizados los recuentos de supervivencia, se recuperaron 10 larvas vivas por cada uno de los tratamientos ensayados, introduciéndolas secas y en frío en viales de congelación de 2 ml de capacidad y almacenándolas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.

Todos los experimentos se realizaron, como mínimo, por triplicado.

## 6.2. TOXICIDAD RETARDADA

Los estudios de toxicidad retardada tuvieron como finalidad detectar los posibles efectos tardíos producidos por los compuestos de estudio, tras una única administración y un periodo posterior de cultivo en ausencia de los mismos. Se llevaron a cabo exponiendo las larvas a las distintas concentraciones de cada uno de los compuestos durante un tiempo de 24 horas y posteriormente manteniéndolas en cultivo otras 24 horas en medio fresco salino sin droga.

Al igual que en el caso de la toxicidad aguda y siguiendo los mismos procedimientos, se analizó en primer lugar la supervivencia de las larvas y tras ello se procedió a almacenar las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

## 7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 7.1. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial *TRIzol*®, consistente en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina y apto para aislar fracciones separadas de ARN, ADN y proteínas de células y tejidos.

Se extrajeron las larvas almacenadas en los viales de congelación y se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml, donde se homogeneizaron en 300  $\mu\text{l}$  *TRIzol*® y se congelaron en nieve carbónica. Posteriormente se dejaron descongelar en frío y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se recogió el sobrenadante y se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de cloroformo (0.2 ml cloroformo / 1 ml *TRIzol*®), dejando reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos, tras lo cual se centrifugó de nuevo a 12000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La fase acuosa de cada muestra, conteniendo el ARN, fue transferida a otro tubo, donde se precipitó el material genético añadiendo 150  $\mu\text{l}$  de isopropanol (0.5 ml isopropanol / 1 ml *TRIzol*®). Finalmente, se lavaron las muestras añadiendo 300  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% frío (1 ml etanol / 1 ml *TRIzol*®) y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El ARN precipitado se resuspendió en 44  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC (Sigma) al 0.1% v/v.



Para eliminar posibles restos de ADN arrastrados durante el proceso de extracción, se llevó a cabo un tratamiento de las muestras con enzima ADNasa libre de ARNasa. Las muestras de ARN se llevaron a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  añadiendo a los 44  $\mu\text{l}$  de la extracción 1  $\mu\text{l}$  de la enzima y 5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 10x. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Una vez incubadas, se añadieron a las muestras 100  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC (0.1% v/v) y 150  $\mu\text{l}$  de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), tras lo cual se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se añadió la fase acuosa a una columna *Phase Lock Gel* junto con el mismo volumen de cloroformo, agitando bien a mano la mezcla y centrifugando de nuevo a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Se tomó el sobrenadante, se añadió un volumen de isopropanol, se agitó a mano y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante. Se añadieron al sedimento 300  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% frío y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Por último se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 50  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC (0.1% v/v).

La integridad del ARN extraído se comprobó corriendo 2  $\mu\text{l}$  de dicho ARN en un gel de agarosa al 1.5%. Para determinar la cantidad de ARN de las muestras se midió la absorción a 260 nm, considerándose fiables los valores comprendidos entre 0.1 y 1 unidades de absorción. Una unidad de absorción a 260 nm equivale a 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ARN.

Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

## 7.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Los niveles de expresión de los distintos genes seleccionados para este trabajo se pudieron medir gracias al empleo de las técnicas de RT-PCR y Real Time PCR, consistentes ambas en una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. Estas técnicas permitieron obtener, a partir de pequeñas cantidades del ARN mensajero (ARNm) contenido en las muestras de ARN extraídas anteriormente, los fragmentos correspondientes de ADN complementario (ADNc), que a su vez sirvieron como molde para su amplificación por PCR.

La transcripción inversa, o retrotranscripción, del ARN de las muestras se llevó a cabo utilizando el kit comercial *M-MLV Reverse Transcriptase*.

A 500 ng de nuestra muestra de ARN se añadieron 0.5  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 1  $\mu\text{l}$  10 mM mezcla dNTP y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12  $\mu\text{l}$ . Se incubó esta mezcla durante 5 minutos a 65 °C y posteriormente se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Se añadieron a continuación 4  $\mu\text{l}$  5x First-Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  0.1 M DTT y 1  $\mu\text{l}$  RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 unidades  $\mu\text{l}^{-1}$ ) y se incubó la mezcla durante 2 minutos a 37 °C. Tras la incubación se añadió 1  $\mu\text{l}$  de M-MLV RT y se volvió a incubar a 37 °C, esta vez durante 50 minutos. Finalmente, se inactivó la reacción incubando 15 minutos a 70 °C.

Las muestras de ADNc se conservaron a -20 °C hasta su uso.

### 7.3. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR

Las amplificaciones por PCR semicuantitativa de los fragmentos de los genes se llevaron a cabo utilizando la enzima Taq Polimerasa, siguiendo las especificaciones de la casa comercial, en un termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (Bio-Rad).

Para asegurar la mayor homogeneidad de los componentes de la PCR y minimizar los errores finales derivados del pipeteo, se estableció un protocolo de preparación de las muestras a amplificar, tal y como se detalla en la Figura 12.

Asimismo, para permitir la normalización de los resultados de expresión génica con respecto al gen de referencia seleccionado, la amplificación de los fragmentos de estudio se llevó a cabo en paralelo y de forma simultánea mediante dos programas distintos del termociclador (ver Tabla 10), atendiendo a los ciclos en los que cada gen se amplifica correctamente y evitando la saturación de los genes de referencia.

Genes	Programa PCR
<i>act</i> - <i>hsc70</i> - <i>rpL4</i> - <i>rpL13</i> - <i>hsp10</i> - <i>GAPDH</i>	95 °C 5:00 [95 °C 0:30; 55 °C 0:30; 72 °C 0:30] <sup>24</sup>
<i>hsp27</i> - <i>hsp40</i> - <i>hsp70</i> - <i>EcR</i> - <i>ERR</i> - <i>Cyp450</i>	95 °C 5:00 [95 °C 0:30; 55 °C 0:30; 72 °C 0:30] <sup>34</sup>

TABLA 10. Programas de PCR empleados en la amplificación de los distintos genes analizados en este trabajo.

Para la separación de los productos de PCR se emplearon geles de poliacrilamida al 9% en TGE (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, glicina 380 mM, EDTA 2 mM) con 30% acrilamida/bisacrilamida 29:1, persulfato amónico al 10% p/v y TEMED al 100% v/v.

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente y voltaje constante de 60 mV, en un equipo MiniProtein (BioRad). Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol al 50% v/v, Tris-HCl 10 mM pH 7, azul de bromofenol al 0.1% p/v).

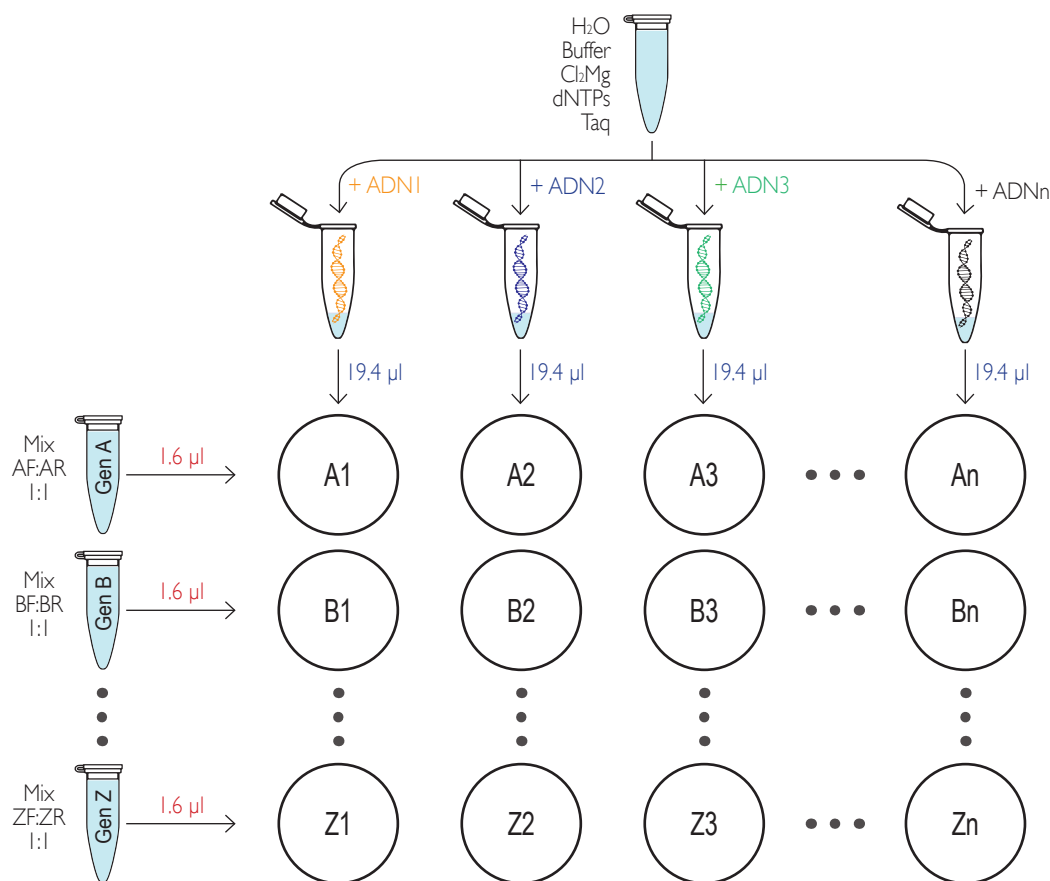


FIGURA 12. Preparación de las muestras para su amplificación por PCR. Esquema para el estudio de la expresión de Z genes (A, B... Z) en n concentraciones de un compuesto (1, 2, 3... n).

Una vez terminada la electroforesis, se fotografió el gel con la ayuda de un equipo Chemigenius 3 (Syngene, Inglaterra), mediante el programa *Gene Snap 6.05*, y se almacenó la imagen para su posterior procesamiento y cuantificación.

La cuantificación de las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida se llevó a cabo con el programa *Image J 1.47q* (NIH, EE.UU.). Ésta se basó en la selección de las distintas bandas del gel manteniendo constante en todas el ancho de banda a cuantificar, de ma-

nera que variaciones en el valor final se correspondieran con diferencias en la intensidad de la banda y no en el área que ocupaba la misma.

## 7.4. ANÁLISIS MEDIANTE REAL TIME PCR

En primer lugar fue necesario conocer la eficiencia de la PCR, dado que este valor se utiliza como factor de corrección en el cálculo de los niveles de expresión génica para cada gen. Para su cálculo, para cada pareja de oligonucleótidos (cebadores) se preparan diluciones seriadas (1/1 - 1/16) de una muestra de ADNc procedente de la mezcla de distintos tratamientos experimentales, lo que proporciona una curva estándar del cambio de los valores de Ct (*cycle threshold*), que es el número de ciclos de PCR necesario para que la señal fluorescente cruce el valor umbral (por ejemplo, la fluorescencia de fondo). Para determinar la eficiencia de amplificación se emplea la pendiente de la regresión lineal obtenida con las diluciones.

Las eficiencias obtenidas para los distintos genes estudiados fueron las siguientes:

Gen	Eficiencia (%)
<i>act</i>	104
<i>26S</i>	90.4
<i>rpL11</i>	88
<i>GPx</i>	82.1
<i>ITS2</i>	78.6

TABLA 11. Eficiencias de los genes empleados en los estudios con RealTime PCR.

Partiendo del ADNc obtenido en el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo la PCR en tiempo real, empleando para ello la mezcla comercial *SsoFast™ EvaGreen® Supermix*. Para obtener un volumen final de reacción de 20 µl se añadieron: 10 µl *SsoFast™ EvaGreen® Supermix*, 0.6 µl cebador directo (10 µM), 0.6 µl cebador inverso (10 µM), 7.8 µl agua bidestilada y 1 µl muestra ADNc (500 ng µl<sup>-1</sup>).

La PCR cuantitativa se llevó a cabo con el termociclador CFX96 (Bio-Rad), mediante un programa que incluía una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C y 35 ciclos con una desnaturalización de 5 segundos a 95 °C, anillamiento durante 15 segundos a 58 °C y elongación durante 10 segundos a 65 °C. Al término de cada programa se realizó una curva de desnaturalización para verificar la eficacia de cada amplicón.

Para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes estudiados se emplearon los valores umbral del ciclo, correspondientes a la fluorescencia detectada en la fase exponencial de la reacción, donde hay una correlación entre la intensidad de la señal fluorescente y la cantidad inicial de ADNc.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa informático CFX-Manager Software 2.1 (Bio-Rad). Este software se empleó en el cálculo de los niveles de cada ARNm con respecto a los de tres genes de referencia endógenos. Se prepararon las muestras por duplicado en las placas correspondientes y se analizaron tres réplicas de cada uno de los experimentos.

## 8. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se extrajeron las larvas almacenadas en los viales de congelación y se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml, donde se homogeneizaron en frío con émbolos durante aproximadamente un minuto en 750  $\mu$ l de tampón TE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM pH 7.8) junto con inhibidor de proteasas *cOmplete EDTA-free* (Roche).

A continuación se centrifugó a 500 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, se recogió el sobrenadante.

Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para determinar la cantidad de proteína de las muestras se empleó el kit comercial *BCA Protein Assay Reagent*, basado en la reacción del ácido biconínico (BCA) con cationes de cobre ( $\text{Cu}^+$ ) para formar un complejo soluble en agua que muestra un incremento lineal de la absorbancia a 562 nm proporcional al aumento en la concentración de proteína.

De manera resumida, durante 30 minutos se incubaron las muestras a medir con los tampones incluidos en el kit, tras lo cual se midieron las absorbancias a 562 nm. Se realizó una recta patrón empleando albúmina de suero bovino y se interpolaron los datos de absorbancia obtenidos con las muestras para obtener la cantidad de proteína presente en cada una de ellas.

## 8.2. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Para la valoración de la actividad de la Glutatión S-Transferasa (GST) se partió de los extractos proteicos obtenidos de grupos de 5 larvas (hasta un total de 20 individuos) para cada uno de los tratamientos experimentales, tal y como se detalló anteriormente.

Esta actividad enzimática se cuantificó espectrofotométricamente mediante el kit comercial *Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit*. Este protocolo emplea 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), un sustrato válido para la detección de un amplio rango de diferentes isoenzimas de la GST.

Un aumento en la conjugación del grupo tiol del glutatión al sustrato CDNB produce un aumento en la absorbancia a 340 nm. Este cambio en los valores de absorbancia se empleó para calcular las variaciones en la actividad de la enzima GST.

## 9. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Con objeto de comprobar si los fragmentos amplificados correspondían realmente a los genes objeto de nuestro estudio, así como con el objeto de utilizar algunos fragmentos como sonda para hibridación *in situ*, se llevó a cabo la clonación y secuenciación de los mismos.

### 9.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DEL GEL DE AGAROSA

Los diferentes fragmentos de los genes de estudio, amplificados mediante PCR, fueron extraídos del gel de agarosa según el procedimiento descrito por Boyle y Lew (1995). Para ello, las bandas correspondientes a los tamaños de fragmentos esperados fueron cortadas del gel e introducidas en tubos Eppendorf. En cada caso, una vez calculado el peso de cada banda se añadió al tubo correspondiente el doble de volumen ( $\mu\text{l}$ ) de NaI 6 M (Fluka) que de peso de la banda en agarosa (mg). Todos los tubos se mantuvieron 5 min en un baño a 55°C hasta conseguir la fusión total de la agarosa. Posteriormente, en cada tubo se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de sílica (Sigma) y se mezclaron bien los componentes. Tras 10 minutos en hielo, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, quedando el ADN unido a la sílica en el fondo de los tubos.

A continuación se realizaron dos series compuestas por:

- Lavado con la misma cantidad de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 2.5 mM, etanol 50% v/v) que la utilizada de NaI 6 M al inicio del proceso. Es importante mezclar bien los tubos con el vórtex para homogeneizar correctamente la solución de lavado y el complejo ADN- sílica.
- Posterior centrifugado de los tubos y retirada del sobrenadante.

Finalmente, el ADN de los tubos se resuspendió en 12 µl de agua destilada.

## 9.2. LIGACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y SIEMBRA

Para su clonación, estos fragmentos fueron ligados al vector pCR® TOPO 2.1 del kit comercial *TOPO TA Cloning®* (Invitrogen). Los productos de las ligaciones se utilizaron para transformar células competentes *Escherichia coli* One Shot® Mach I™-T1<sup>R</sup> de la misma casa comercial. Las mezclas de la transformación se sembraron en placas de LB-agar-ampicilina (50 µg/ml) / X-Gal (40 mg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

El procedimiento seguido fue el descrito por Sambrook y col. (1989), que permite seleccionar las colonias con inserto por el sistema de la β-galactosidasa.

## 9.3. SELECCIÓN DE COLONIAS Y SECUENCIACIÓN DE LAS BACTERIAS POSITIVAS

La detección de las colonias cuyo plásmido llevaba el inserto esperado en cada caso se realizó mediante una PCR directamente de las colonias. Para esto se tomaron con un palillo de madera estéril bacterias de las colonias a analizar y se agregaron a 50 µl de mezcla de reacción con una concentración final de:

- 1x tampón PCR
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 µM dNTPs
- 0.4 µM de cada cebador específico del fragmento de interés
- 0.02 U de Taq Polimerasa

El programa de amplificación constó de 28 ciclos y fue el siguiente:

$$94\text{ }^{\circ}\text{C}_{5:00} [94\text{ }^{\circ}\text{C}_{0:30}; X\text{ }^{\circ}\text{C}_{0:30}; 72\text{ }^{\circ}\text{C}_{0:40}]_{28} 72\text{ }^{\circ}\text{C}_{7:00}$$

La temperatura de anillamiento (X) se ajustó en cada caso a cada una de las parejas de genes, manteniendo los valores detallados con anterioridad en la Tabla I 0.

Cada reacción de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% (p/v). Aquellas colonias en las que se amplificó el fragmento del tamaño esperado se incubaron en 4 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml) durante toda la noche, con agitación fuerte a 37 °C. Para obtener el ADN de los fragmentos clonados se hicieron minipreparaciones según el procedimiento descrito por Sambrook y col. (1989).

Los fragmentos de los genes clonados en estos plásmidos se secuenciaron completamente con los cebadores universales del vector (M13-R y M13-F). La secuenciación se llevó a cabo con productos marcados terminalmente en secuenciadores multicapilar *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems, España) en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Sede de Cantoblanco).

## 10. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

### 10.1. ESTUDIOS DE INMUNOCITOQUÍMICA

Para la detección *in situ* de los híbridos ADN/ARN en los cromosomas politénicos se siguió el procedimiento inmunocitoquímico descrito por Díez y Baretino (1984). Las glándulas salivares fueron extraídas de larvas de estadio IV y fijadas durante 2 minutos en una mezcla de etanol:ácido acético (3:1). Posteriormente se realizó el aplastado en ácido acético al 50% (v/v) y se congelaron las preparaciones en nieve carbónica. Tras retirar el cubreobjetos, el material fue deshidratado en etanol absoluto. Posteriormente el material se rehidrató en PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dibásico 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobásico 2 mM) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-ADN/ARN (1:20) (Rudkin y Stollar, 1977) en solución de bloqueo (PBS 1x, *Blocking reagent* al 1% p/v). Dicho anticuerpo fue proporcionado por el Dr. José Luis Díez (CSIC, España). Tras la incubación, las



preparaciones se lavaron tres veces con una solución de lavado PT (PBS 1x, Tween 20 0.1% v/v). La detección se realizó con un anticuerpo secundario anticabra conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC), en una solución de bloqueo (1:80) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados posteriores con PT, las preparaciones fueron contrateñidas con Hoechst 33258 (5 µg/ml) durante menos de 1 minuto.

El montaje definitivo de las preparaciones se realizó con medio *ProLong® Gold Antifade Reagent*. Éstas se conservaron a -20 °C hasta su visualización microscópica.

## 10.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Durante el desarrollo de este trabajo se aprovechó para localizar determinados genes (*hsp70* y *hsc70*) utilizados comúnmente como biomarcadores en ensayos de toxicidad. La hibridación *in situ* se realizó sobre cromosomas politénicos extraídos de glándulas salivares de larvas de cuarto estadio *C. riparius*. El material fue extraído y fijado durante 2 minutos en etanol: ácido acético (3:1), tras lo cual se realizó el aplastado o *squash* en ácido acético al 50%. Posteriormente las preparaciones se congelaron en nieve carbónica. Tras retirar el cubreobjetos, el material fue deshidratado en etanol absoluto. Tras dejarlo secar al aire, los cromosomas se desnaturalizaron en SSC 2x (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M) a 65 °C durante 45 minutos y se deshidrataron en series consecutivas de 10 minutos de etanol al 50% y al 100%. Posteriormente el material se trató con NaOH 0.07 N durante tres minutos y se rehidrató en PBS 1x antes de proceder a la incubación.

Las sondas fueron desnaturalizadas a 80 °C durante 8 minutos inmediatamente antes de su uso. La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos en solución PT (PBS 1x, Tween 20 al 0.1% v/v).

La detección se llevó a cabo mediante un anticuerpo secundario anti-digoxigenina (1:100), conjugado con isocianato de rodamina (TRITC) (Roche).

Las preparaciones fueron contrateñidas con Hoechst 33258 como se indicó en el apartado anterior. Del mismo modo, se montaron con medio *ProLong® Gold Antifade Reagent* y se conservaron a -20 °C hasta su visualización microscópica.

## 10.3. TRATAMIENTO DE LAS IMÁGENES

Las imágenes de preparaciones microscópicas fueron capturadas con una cámara Leica DFC310FX (Leica Microsystems, Alemania) acoplada a un microscopio Leica DMI300B (Leica Microsystems) o, en algunos casos, mediante una cámara Cool Snap (Photometrics, EE.UU.) acoplada a un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes tomadas fueron procesadas con el software Leica Application Suite 3.5.0 (Leica Microsystems) y el programa Adobe® Photoshop® CS6 (Adobe Systems Incorporated, California, EE.UU.).

## 11. BÚSQUEDA EN LAS BASES DE DATOS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas para algunos genes que no habían sido utilizados previamente en nuestro laboratorio, como *rpL4* o *hsp10*, fueron analizadas con el programa BLAST en las bases de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología de Estados Unidos (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Los alineamientos se realizaron utilizando los programas CLUSTAL\_X (Thompson y col., 1997) y MAFFT 7 (Katoh y Standley, 2013).

El árbol filogenético fue generado utilizando el programa MEGA 5.2 (Tamura y col., 2011) mediante el método *UPGMA*. Se utilizó el modelo de Poisson para la estimación de distancias y los valores de parsimonia en los nodos se calcularon en base a 1000 réplicas.

## 12. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

La recopilación de los datos procedentes de los distintos estudios y la elaboración de las gráficas se llevó a cabo con la ayuda del siguiente software:

- Microsoft® Excel® 2011 para Mac (versión 14.3.6) (Microsoft Corporation, Washington, EE.UU.)
- Numbers '09 (versión 2.3) (Apple, California, EE.UU.)

Para todos los resultados experimentales se calcularon tanto la media (M) como su error estándar (SE), reflejándose ambos posteriormente en todas las representaciones gráficas del presente trabajo.

Los valores de LC50 en los estudios de supervivencia se calcularon con el programa Probit 3.2, de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*).

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se llevaron a cabo con el software IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, Nueva York, EE.UU.). Para llevar a cabo un análisis estadístico que permitiese detectar diferencias significativas entre las muestras tratadas y las muestras control se realizaron al menos tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno (el número de experimentos fue diferente en función del parámetro evaluado y el tipo de metodología necesaria para su estudio).

Para cada parámetro estudiado se realizaron los test normalidad y homocedasticidad, Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. En función de la información obtenida en estos test, los datos se analizaron de la siguiente forma:

- Si las muestras podían considerarse homogéneas y normales (paramétricas), los datos normalizados se analizaron mediante el test ANOVA, seguido de un test *post hoc* Games Howell o Tukey, en cada caso el más apropiado. Las diferencias se consideraron significativas a un valor  $p < 0.05$ .
- Si las muestras no eran homogéneas o no presentaban una distribución normal (consideradas como no paramétricas), se empleó el test de Kruskal-Wallis, y las diferencias entre los pares se analizaron mediante el test U de Mann-Whitney. En este caso las probabilidades fueron corregidas mediante la corrección Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a un valor  $p < 0.05$ .



The graph displays a probability density function for the number of correct answers on a 10-item multiple-choice test. The x-axis is labeled with integers from 4 to 10, and the y-axis represents the probability density. The curve starts at 4, rises to a peak at 7, and then declines. A shaded region is indicated under the curve between 8 and 10 correct answers.



# I. DIANAS DE TOXICIDAD

Los estudios llevados a cabo en larvas de *Chironomus riparius*, procedentes tanto de cultivos de laboratorio como de poblaciones naturales de Galicia, evaluaron los efectos tóxicos del di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butil bencil ftalato (BBP) sobre distintas dianas de toxicidad y bajo diferentes condiciones de exposición (tiempo y concentración).

La primera diana de toxicidad analizada fue la supervivencia de las larvas en las distintas condiciones de exposición. Para analizar los efectos de los dos compuestos tras 24 horas de tratamiento se seleccionó en primer lugar un rango amplio de concentraciones, entre  $10^{-3}$  y  $10^5 \mu\text{g l}^{-1}$ . Para los estudios a tiempos más largos (entre 48 y 96 horas) se seleccionó un rango donde a 24 horas las concentraciones ensayadas no hubieran mostrado letalidad significativa, concretamente entre  $10^{-3}$  y  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Los estudios de expresión génica constituyeron la segunda diana de toxicidad analizada en el presente trabajo. Se analizó la expresión de genes relacionados con procesos celulares de vital importancia y se evaluaron las alteraciones en el patrón de expresión en cromosomas politénicos.

Por último, se seleccionó la concentración representativa de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  para llevar a cabo el análisis de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa (GST), que juega un importante papel como ruta de detoxificación celular, tanto para el caso de sustancias endógenas como para el de xenobióticos.

## I.1. SELECCIÓN DE LAS RUTAS CELULARES Y GENES DE ESTUDIO

Para el estudio de los efectos del DEHP y el BBP a nivel celular se analizaron cuatro importantes procesos fisiológicos: 1) biogénesis de ribosomas, por su relación con la supervivencia de las células en el nivel más básico; 2) respuesta celular a estrés, por su importancia en los procesos adaptativos celulares a condiciones del medio donde peligra la supervivencia de la larva; 3) ruta hormonal de la ecdisona, por su importancia como proceso endocrino y por ser imprescindible para el desarrollo y la supervivencia de los insectos; y 4) metabolismo celular, por englobar reacciones indispensables en la homeostasis y la supervivencia celular, como la obtención de energía y las reacciones de detoxificación.

Para cada uno de estos procesos celulares, se seleccionaron las siguientes dianas:

- Biogénesis de ribosomas: el espaciador intergénico *ITS2* y genes que codifican para las proteínas ribosómicas RPL4, RPL11 y RPL13.
- Respuesta celular a estrés: genes que codifican para las proteínas de choque térmico HSC70, HSP70, HSP40, HSP27 y HSP10.
- Ruta endocrina: genes que codifican para el receptor de ecdisona (EcR) y el receptor relacionado con estrógenos (ERR).
- Metabolismo celular: actividad de la glutatión S-transferasa (GST) y genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA-PDH), el citocromo P450 (CYP450) y la glutatión peroxidasa (GPx).

### **Biogénesis de ribosomas**

Los efectos tóxicos de los dos ftalatos sobre la biogénesis de los ribosomas se abordaron desde dos perspectivas diferentes. Por un lado, mediante el estudio de ARNr de nueva síntesis. Por otro lado, analizando las proteínas ribosómicas.

El análisis del ARN ribosómico se basó en la cuantificación de los niveles de ARNr no maduro sintetizado tras la exposición a los compuestos. Esta medida se llevó a cabo mediante la amplificación y posterior cuantificación de los niveles del espaciador intergénico *ITS2*, que se encuentra en los ARN prerribosómicos de tamaños 32S y 45S. Los niveles de expresión de *ITS2* se referenciaron con respecto a niveles correspondientes de ARNr maduro 26S, utilizado como control interno en el estudio en base a dos características: se acumula en la célula en gran cantidad y posee una elevada vida media. De este modo, para cada una de las condiciones experimentales ensayadas, las señales de la banda correspondiente al gen *ITS2* en los geles se normalizaron con respecto a las señales equivalentes de la banda de ARNr 26S. Posteriormente, los valores de expresión obtenidos para las distintas exposiciones a los compuestos fueron a su vez normalizados con respecto a los obtenidos en larvas no expuestas.

Por otro lado, las proteínas ribosómicas son las moléculas que junto con el ARNr conforman los ribosomas. En la última década se han identificado gran cantidad de ellas en diferentes organismos eucariotas, si bien en *Chironomus* tan sólo han sido descritos varios representantes: los genes *rpL8* (Govinda y col., 2000), *rpL11* y *rpL13* (Martínez-Guitarte y col., 2007), *rpL15* (Nair y Choi, 2011), *rpS3* y *rpS6* (Park y Kwak, 2012). El alto grado de homología en la secuencia de los aminoácidos que comparten estas proteínas en organismos muy distantes a nivel evolutivo, proporciona una idea de la importancia tanto del proceso fisiológico que controlan como de las estructuras celulares de las que forman



parte. Se seleccionaron para su análisis en el presente trabajo los genes *rpL11* y *rpL13*, previamente secuenciados en nuestro laboratorio (Martínez-Guitarte y col., 2007), y se desarrollaron asimismo las labores de identificación, secuenciación y clonaje del gen *rpL4*, para su posterior estudio.

### **Respuesta celular a estrés**

La exposición de los organismos a compuestos tóxicos como el DEHP y el BBP constituye una situación de estrés y podría desencadenar una respuesta típica frente al mismo, afectando a la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs). Por este motivo, resulta interesante el análisis de los niveles de expresión de diferentes genes que codifican para algunas de estas proteínas en *C. riparius*. Esto nos facilita una aproximación al grado de estrés que presentan los individuos expuestos, permitiendo asimismo la búsqueda de dianas específicas relacionadas con el tipo de respuesta que se desencadena.

Uno de los genes utilizados en este estudio como biomarcador de estrés celular fue *hsp70* (Morcillo y col., 1993, 1997; Morales y col., 2011), que ha demostrado ser sensible a un amplio rango de situaciones de estrés medioambiental. Además, se ha descrito su papel en los procesos de plegamiento de estructuras proteicas, entre las que se encuentra el EcR. Estas características lo convierten en un gen especialmente interesante para, por un lado, su uso como biomarcador de estrés ambiental y, por otro lado, aportar información sobre la posible actividad disruptora endocrina de un compuesto en *C. riparius*.

Junto con la forma inducible de la proteína de choque térmico de 70 kDa, dentro de esta familia proteica se encuentra también la forma constitutiva (HSC70; *Heat Shock Cognate 70*). Los genes que codifican para ambas proteínas han sido descritos hasta la fecha en la mayoría de especies de insectos utilizadas en investigación, en especial en dípteros y lepidópteros, siendo especialmente escasos los datos en himenópteros (Wang y col., 2008). Aunque se dan casos excepcionales de inducción de esta forma constitutiva en determinadas condiciones de estrés, como es la descrita en choque térmico, por lo general se considera un gen muy estable frente a los cambios del medio y sus niveles de expresión no sufren variaciones significativas bajo condiciones en las que sí se induce la expresión del gen *hsp70* (Denlinger y col., 2001; Qin y col., 2003). Por este motivo resulta especialmente interesante el estudio del gen *hsc70* en situaciones de estrés ambiental no relacionadas con el aumento de temperatura.

Se seleccionó también para este estudio la proteína de choque térmico HSP40, implicada junto con HSP70 en asegurar el correcto plegamiento de muchas proteínas y en procesos de degradación proteosómica (Schlecht y col., 2011; Silflow y col., 2011;

Summers y col., 2013). Dada su múltiple funcionalidad, resulta interesante el estudio de las alteraciones que puedan producirse en sus niveles de expresión en presencia de compuestos tóxicos como el DEHP y el BBP.

Respecto a las HSPs de bajo peso molecular, como son HSP27 y HSP10 (mitocondrial), su papel como chaperonas las involucra en funciones celulares muy variadas, como son la respuesta a situaciones de termotolerancia, la regulación del desarrollo de las células, la inhibición de la apoptosis y la transducción de señales (Feder y Hofmann, 1999). Sin embargo, estas proteínas no han sido descritas hasta la fecha en *Chironomus* y actualmente no hay datos publicados en este organismo sobre las alteraciones que se producen en los genes que las codifican frente a una exposición a contaminantes ambientales. Por tanto, puede ser de gran utilidad su identificación y caracterización, así como la evaluación de su potencial como biomarcadores de efecto temprano de estrés por exposición a tóxicos.

Las labores de identificación, clonaje y secuenciación del gen *hsp10* se han llevado a cabo dentro del presente trabajo, tal y como se detalla más adelante. En relación con el gen *hsp27*, la información equivalente ha sido obtenida por el Grupo de Biología y Toxicología Ambiental de la UNED en el marco de la Tesis Doctoral de Pedro José Martínez de Paz, en curso en la actualidad.

### **Ruta endocrina**

Dada la capacidad del DEHP y el BPP de actuar como disruptores endocrinos en vertebrados, se planteó la posibilidad de que fueran también capaces de alterar la ruta hormonal mediada por ecdisona, esencial dentro del sistema endocrino de insectos. De ser así, esta interacción constituiría un primer paso hacia el conocimiento de los mecanismos de acción tóxica de estos compuestos en invertebrados, actualmente bastante limitado y en especial en el caso del BBP. La capacidad de interacción de xenobióticos con la ruta endocrina de *Chironomus riparius* se describió por primera vez a nivel molecular en nuestro laboratorio, en larvas expuestas a dosis agudas y subletales de bisfenol-A y cadmio (Planelló y col., 2008, 2010).

Se analizaron los niveles de expresión del gen *EcR* para estudiar la capacidad de los ftalatos seleccionados de actuar como disruptores endocrinos en invertebrados. Este gen codifica para el receptor de la ecdisona y forma junto con el ultraespiráculo (*usp*) el complejo EcR/USP, responsable de la activación de la cascada transcripcional que controla la muda y la metamorfosis en insectos.

Por otro lado, en este trabajo se llevó a cabo también el estudio del gen *ERR*, que codifica para un receptor relacionado con estrógenos y que ha sido descrito recién-

temente en *C. riparius* (Park y Kwak, 2010). Aunque ya ha sido descrita la capacidad de determinados EDCs de alterar la expresión de este gen, los datos de los que se dispone hasta la fecha en invertebrados son limitados. Dado que la mayoría de los EDCs catalogados hasta el momento interfieren con hormonas esteroideas, especialmente estrógenos, resulta de especial interés abordar el estudio en invertebrados del comportamiento de este receptor bajo los efectos de compuestos con capacidad disruptora endocrina.

### **Metabolismo celular: obtención de energía y detoxificación**

Para evaluar los efectos tóxicos de DEHP y BBP sobre el metabolismo energético se ha realizado una aproximación a través del análisis de la expresión del gen *GAPDH*. Su estudio es especialmente interesante debido a su multifuncionalidad ya que, aunque está relacionado fundamentalmente con la glucólisis, participa también activamente en otros muchos procesos celulares, como se ha descrito con anterioridad.

Por otro lado, los procesos de detoxificación fueron evaluados a través de los niveles de expresión de los genes del citocromo P450 (*CYP450*) y la glutatión peroxidasa (*GPx*), así como de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (*GST*).

Las proteínas *CYP450* y *GST*, involucradas respectivamente en la Fase I y la Fase II de los procesos de biotransformación, componen dos grandes grupos de enzimas detoxificadoras multifuncionales, responsables de metabolizar en los organismos una gran variedad de compuestos, tanto xenobióticos como endógenos. Al estar relacionados con la capacidad de los organismos expuestos para metabolizar xenobióticos, resulta de gran interés evaluar el papel de ambos genes como marcadores de efecto, pudiendo su estudio proporcionar una idea de la alteración de estos procesos y/o de las capacidades adaptativas de dichos organismos a determinados tóxicos mediante mecanismos de tolerancia/resistencia (Conney, 2003; Ranson y col., 2002; Martínez-Paz y col., 2012). Asimismo, conviene resaltar que el metabolismo de la ecdisona está relacionado con la actividad del *CYP450* (Guittard y col., 2011), por lo que son también de sumo interés los cambios que puedan producirse en presencia de compuestos tóxicos en relación con su posible capacidad disruptora endocrina en insectos.

Finalmente, la enzima glutatión peroxidasa (*GPx*) protege a la célula del daño oxidativo gracias a su capacidad de degradar especies reactivas de oxígeno, generadas habitualmente en el proceso de metabolización de los xenobióticos e implicadas en importantes daños celulares en múltiples tejidos. Distintos trabajos han comprobado la expresión diferencial de este gen en las distintas etapas del desarrollo de insectos, quedando asimismo demostrada su alteración ante la exposición a xenobióticos, como el cadmio (Nair y col., 2012).

## **I.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *hsp10* Y *rpL4* EN *Chironomus riparius***

### **I.2.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A LOS GENES *hsp10* y *rpL4***

El punto de partida para la elección de los fragmentos de los genes *hsp10* y *rpL4* a utilizar en este estudio fue diferente en cada caso, dependiendo de la información existente respecto a cada gen y a su correspondiente proteína en las bases de datos de secuencias. En ambos casos, los alineamientos se realizaron utilizando los programas CLUSTAL\_X y MAFFT 7. A partir de las regiones más conservadas se diseñaron las parejas de oligonucleótidos, tal y como se detalla a continuación:

#### **hsp10**

La secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína HSP10 de *Chironomus tentans* se obtuvo a partir de la base de datos de esta especie publicada por Arvestad y col. (2005). Aunque se esperaba un alto grado de homología con la secuencia equivalente de *Chironomus riparius*, dada la proximidad a nivel evolutivo de ambas especies, se decidió llevar a cabo en la misma base de datos comparaciones entre la secuencia descrita en *C. tentans* y secuencias homólogas de aminoácidos de otras especies de artrópodos, en su mayoría insectos. De esta forma, se eligieron para los alineamientos las secuencias de aminoácidos indicadas en la Tabla 12. A partir de las regiones más conservadas de esta proteína en todas las especies comparadas (Figura 13), se realizó el alineamiento de las mismas regiones en las correspondientes secuencias de nucleótidos (Figura 14 y Tabla 12). De este modo, las secuencias de los cebadores seleccionadas sobre la secuencia de *C. tentans* pertenecen a las regiones que comparten mayor homología entre todas las especies estudiadas.

*Chironomus tentans* MS-----GAIKRLIPLMDRILVQRAEAITKTKGGIVLPEKAQSKVLRAITVAVCGPGA  
*Pediculus humanus* MAAAVKQFVPALKRLVPLFDRVLVQRAEAVTKTKGGIVLPEKAQSKVLHGTVVAVGPGS  
*Tribolium castaneum* M-----Q-SGAARKLIPFLDRVLIKKAEMVTKTKGGIVLPEKAQAKVLQGTVVAVGPGA  
*Nasonia vitripennis* MAAA-----AAVKRLIPFLDRVLQRAEALTTKTKGGIVLPEKAQSKVLRGTVVAIGPGS  
*Apis mellifera* MAA-----TNAIKRLIPFLDRVLVQRAEAITKTKGGIVLPEKAQAKVLQGTVVAVGPGQ  
*Aedes aegypti* MAS-----KRLIPLLDRLVQRAEALTTKTKGGIVLPEKAQSKVLEGTIVAVGPGA  
*Armigeres subalbatus* MAS-----KRLIPLLDRLVQRAEALTTKTKGGIVLPEKAQSKVLEGTIVAVGPGA  
*Culex quinquefasciatus* MAS-----RRLIPLLDRLVQRAEALTTKTKGGIVLPEKAQSKVLEGTIVAVGPGA  
*Anopheles gambiae* MSAV-----KRLIPLLDRLVQRAEALTTKTKGGIVLPEKAQSKVLEGTIVAVGPGA  
*Drosophila erecta* MAAA-----IKKIIPMLDRILIQRAEALTTKTKGGIVLPEKSVGKVLEGTIVAVGPGT  
*Drosophila willistoni* MAAA-----IKKIIPMLDRILIQRAEALTTKTKGGIVLPEKSVGKVLEGTIVAVGPGT  
*Ixodes scapularis* MAGL-----GKRLVPLLDRIILVERFVPEAKTKGGIMLPEKAQAKVQSATVIAVGTGA  
 \* \* \* \* \*

*Chironomus tentans* RN-QKGEYIKMGVSVGDQVLLPEYGGTKVELD--DQKEYHLFKEGDILAKIE-  
*Pediculus humanus* RN-QNGEFIPLAVKVGDKVLLPEYGGTKVELE--ENKEFHLFRESIDILAKVE-  
*Tribolium castaneum* RN-NNGETVPLTVKVGDNVLLPEYGGTKVELE--ENQEYHLFRESIDILAKLTQ  
*Nasonia vitripennis* RN-DKGEHIPPSIKVGDVLLPEYGGTKVELE--ENKEFHLFRESIDILAKLEA  
*Apis mellifera* RN-DKGEHIPPLSIKVGDIVLLPEYGGTKVEFE--DNKEFHLFRESIDILAKLEV  
*Aedes aegypti* RNSQTGQHVPLAVTVGEKVLLPEYGGTKVDLG--DTKEYHLFREADILAKIE-  
*Armigeres subalbatus* RNSQTGQHVPLAVTVGEKVLLPEYGGTKVDLG--DSKEYHLFRETIDILAKIE-  
*Culex quinquefasciatus* RNAQTGQHVALGVTVGEKVLLPEYGGTKVDLG--DAKEYHLFRESIDILAKID-  
*Anopheles gambiae* RHAQTGEHVPLSVKVGGEKVLLPEYGGTKVDLG--DSKEYHLFREADILAKME-  
*Drosophila erecta* RNASTGNHPIGVKEGDRVLLPEFGGTKVNLEG-DQKELFLFRESIDILAKLE-  
*Drosophila willistoni* RNVTTGNHPIGVKEGDRVLLPEFGGTKVNLEGDDKKEFLFRESIDILAKLE-  
*Ixodes scapularis* RT-EAGQTIPPVAKGDKVLLPEYGGTKVEI---DNKEYIFRDSVDVLGKWS  
 \* \* \* \* \*

FIGURA 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína HSP10 en *C. tentans*. Los asteriscos (\*) señalan los aminoácidos conservados en todas las secuencias (amarillo) y los recuadros recogen las regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos.

*Chironomus tentans* ATGTCTG-----GTGCAATCAAGAGATTAAATTCATTAATG  
*Pediculus humanus* ATGGCAGCAGCTGTAAACCACAATTGTACCAGCATTGAAAGATTGGTTCCATTATTC  
*Tribolium castaneum* ATGGCT-----GCAACTAATGCCATTAAGAGACTTATACCTCTCTTC  
*Nasonia vitripennis* ATGGCT-----GCTGCAGCTGCTGTTAAGAGGCTAATTCCTCTGTTT  
*Apis mellifera* ATGCAG-----TCTGGAGCTGCCAAACGCTTGATTCCCTCTCTTC  
*Armigeres subalbatus* ATGGCA-----TCCAAGCGTTTGATTCCCTCTTTTG  
*Aedes aegypti* ATGGCC-----TCCAAGCGTTTGATTCCCTCTGTTG  
*Culex quinquefasciatus* ATGGCT-----TCCCGTCGCTGATTCCGCTGCTG  
*Anopheles gambiae* ATGTCT-----GCCGTTAAGCGTCTACTGCCGCTGCTG  
*Drosophila erecta* ATGGCC-----GCCGCTATCAAGAAGATCATACCATGCTG  
*Drosophila willistoni* ATGGCC-----GCCGCTATCAAGAAAATCATCCCAATGCTG  
*Ixodes scapularis* ATGGCT-----GGACTGGGCAAGAGGCTAGTGGCGCTGCTG  
 \* \* \* \* \*

FIGURA 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos homólogas a la que codifica para la proteína HSP10 en *C. tentans*. Los asteriscos (\*) señalan los nucleótidos conservados en todas las secuencias (amarillo) y los recuadros recogen las regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos.

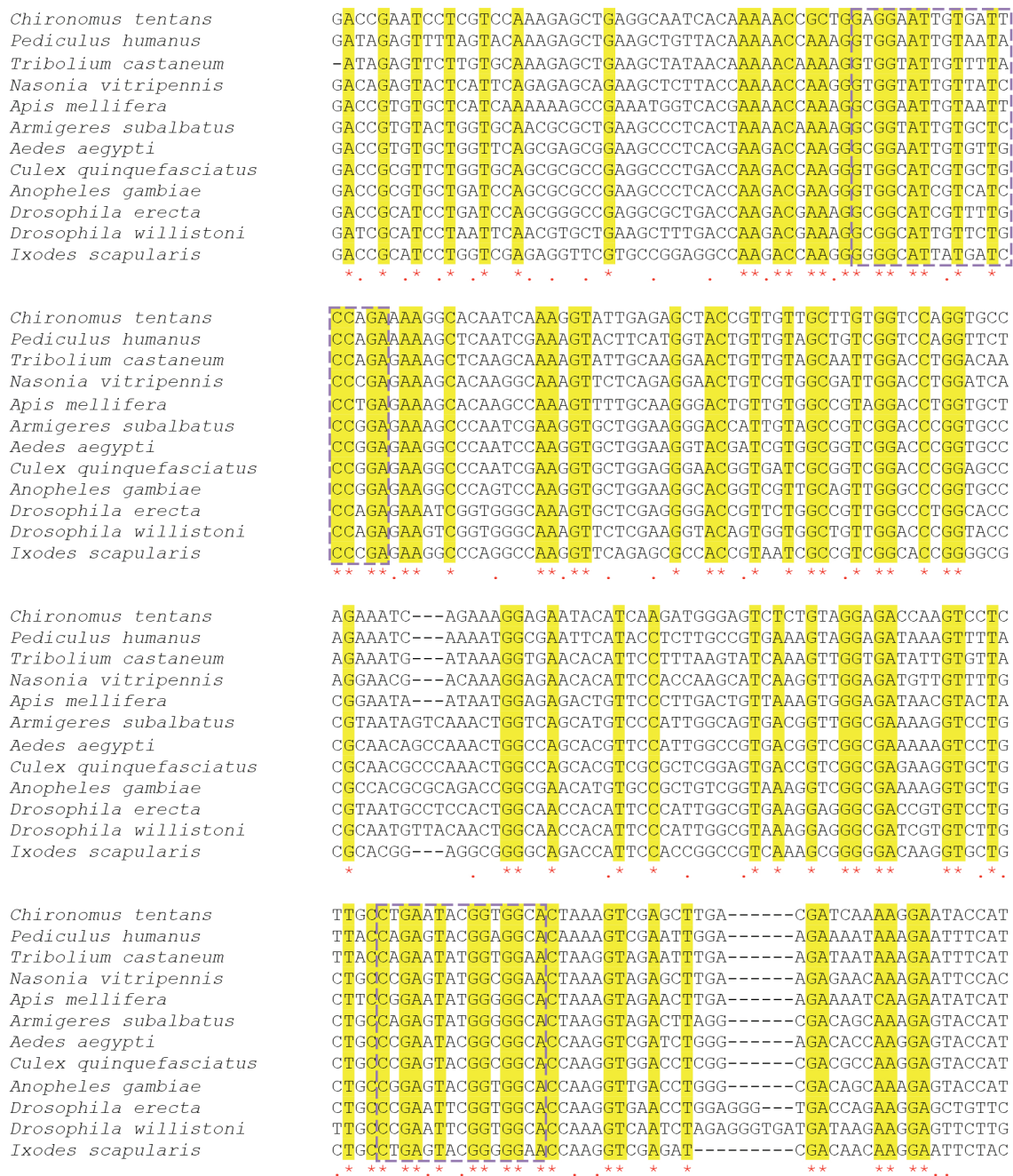


FIGURA 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos homólogas a la que codifica para la proteína HSP10 en *C. tentans*. Los asteriscos (\*) señalan los nucleótidos conservados en todas las secuencias (amarillo) y los recuadros recogen las regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos.



*Chironomus tentans* TTATTCAAGGAAGGCGATATTCTCGCAAAAATAGAA---TAA  
*Pediculus humanus* CTTTTTAGAGAAATCTGATATTTGGCCAAAGTA---GAAAGTAG  
*Tribolium castaneum* TTATTCCGTGAGTCAGATATACTGGCAAAATTAGAAGTTTAA  
*Nasonia vitripennis* TTGTTCCGTGAATCTGATATTCTAGCCAAGTTGGAGGCAATA  
*Apis mellifera* CTTTTCAGGGAATCAGATATTCTAGCCAAAATTGACGCAGTAA  
*Armigeres subalbatus* TTGTTCCGCGAGACGGACATTCTTGCCAAAATC---GAAAGTAG  
*Aedes aegypti* TTGTTCCGCGAGGCGGACATTCTTGCCAAAATC---GAAAGTAG  
*Culex quinquefasciatus* CTGTTCCGCGAGTCGGACATCCTGGCCAAAATC---GATAGTAG  
*Anopheles gambiae* CTCTTCCGGGAAGCCGACATTCTGGCCAAAGATG---GAGTAA  
*Drosophila erecta* CTCTTCCGCGAGTCCGACATCCTGGCCAAACTG---GAGTAG  
*Drosophila willistoni* CTTTTCCGTGAATCTGACATTCTTGCCAAAATG---GAAAGTAG  
*Ixodes scapularis* ATCTTCCGGGACAGCGACGTCCTTGCCAAAGTGGAGCGACTGA  
 \* \* \* \* \*

FIGURA 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos homólogas a la que codifica para la proteína HSP10 en *C. tentans*. Los asteriscos (\*) señalan los nucleótidos conservados en todas las secuencias (amarillo) y los recuadros recogen las regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos.

Especie	Aminoácidos		Nucleótidos	
	No. de acceso	(aa)	No. de acceso	(pb)
<i>Pediculus humanus</i>	XP_002428683	109	XM_002428638.1	330
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_975179.1	103	XM_970086.1	312
<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001599992.1	104	XM_001599942.2	604
<i>Apis mellifera</i>	XP_624910.1	104	XM_624907.3	835
<i>Armigeres subalbatus</i>	---	102	EU205741.1	646
<i>Aedes aegypti</i>	XP_001657881.1	100	XM_001657831.1	1259
<i>Culex quinquefasciatus</i>	XP_001848951.1	100	XM_001848899.1	921
<i>Anopheles gambiae</i>	XP_321619.3	101	XM_321619.4	1029
<i>Drosophila erecta</i>	XP_001972611	103	XM_001972575.1	312
<i>Drosophila willistoni</i>	XP_002062093.1	104	XM_002062057.1	315
<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002433721	101	XM_002433676.1	619

TABLA 12. Números de acceso y longitud de las secuencias parciales de aminoácidos (aa) y nucleótidos (pb) homólogas de la proteína HSP10 de *C. tentans*, en las distintas especies utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos para amplificar este gen en *C. riparius*.

## rpL4

La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *rpL4* de *Chironomus riparius* se obtuvo a partir de una pareja de oligonucleótidos cedida por Tatsuya Yoshimi, la cual, según él mismo nos informó, amplificaba un fragmento del gen que codifica para la proteína ribosómica L1 (RPL1) en *Chironomus yoshimatsui* (datos no publicados). Estos oligonucleótidos nos permitieron amplificar un fragmento de 149 pb en *C. riparius*. Sin embargo, y a pesar de que las secuencias de los cebadores tenían en nuestra especie una homología del 100%, los estudios comparativos sobre las bases de datos genómicas mostraron una elevada homología del fragmento amplificado en nuestro laboratorio con secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al gen *rpL4*, no a *rpL1*.

Como parte final de este estudio y con el fin de decidir definitivamente a qué gen se correspondía el fragmento amplificado, se realizó un análisis filogenético del mismo. En la Tabla 13 se muestran las secuencias de aminoácidos de RPL1 y RPL4 de distintas especies de artrópodos utilizadas en este análisis, en su mayoría insectos. Como grupo externo en la comparación se utilizó la secuencia correspondiente a la proteína ribosómica RPL1 I de *C. riparius*, aislada y descrita por nuestro grupo (Martínez y col., 2007). La Figura 15 muestra las relaciones filogenéticas moleculares entre el fragmento de RPL4 de *C. riparius* aislado en el laboratorio y las secuencias correspondientes a las proteínas RPL1 y RPL4 en distintos insectos. Los resultados muestran claramente una agrupación de las proteínas RPL1 independiente de la que se produce entre las distintas RPL4, donde se sitúa la aislada en *C. riparius* para este trabajo. En base a esto, finalmente identificamos el fragmento amplificado como correspondiente al gen *rpL4* de *C. riparius* y se utilizó así en los estudios posteriores para evaluar los posibles cambios en la expresión génica tras la exposición a DEHP y BBP.

	No. de acceso	Especie	Longitud (aa)	Nodo
RPL4	NP_524538	<i>Drosophila melanogaster</i>	401	Diptera
	XP_002074029.1	<i>Drosophila willistoni</i>	427	Diptera
	ABF18487.1	<i>Aedes aegypti</i>	431	Diptera
	XP_001845558.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	436	Diptera
	AAX62435.1	<i>Lysiphlebus testaceipes</i>	429	Himenoptera
	XP_001608023.1	<i>Nasonia vitripennis</i>	431	Himenoptera
	ACB12079.1	<i>Heliothis virescens</i>	426	Lepidoptera
	ACY95317.1	<i>Manduca sexta</i>	439	Lepidoptera

TABLA 13. Números de acceso y longitud de las secuencias homólogas de aminoácidos de las proteínas RPL4 y RPL1 en las distintas especies utilizadas en el estudio filogenético.



	No. de acceso	Especie	Longitud (aa)	Nodo
RPLI	NP_524275.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	354	Diptera
	EDS31219.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	358	Diptera
	XP_001649513.1	<i>Aedes aegypti</i>	359	Diptera
	EEB19565.1	<i>Pediculus humanus</i>	376	Siphonaptera
	XP_001120018.1	<i>Apis mellifera</i>	351	Himenoptera
	XP_003400985.1	<i>Bombus terrestris</i>	352	Himenoptera
	NP_001156081.1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	340	Hemiptera

TABLA 13. Números de acceso y longitud de las secuencias homólogas de aminoácidos de las proteínas RPL4 y RPLI en las distintas especies utilizadas en el estudio filogenético.

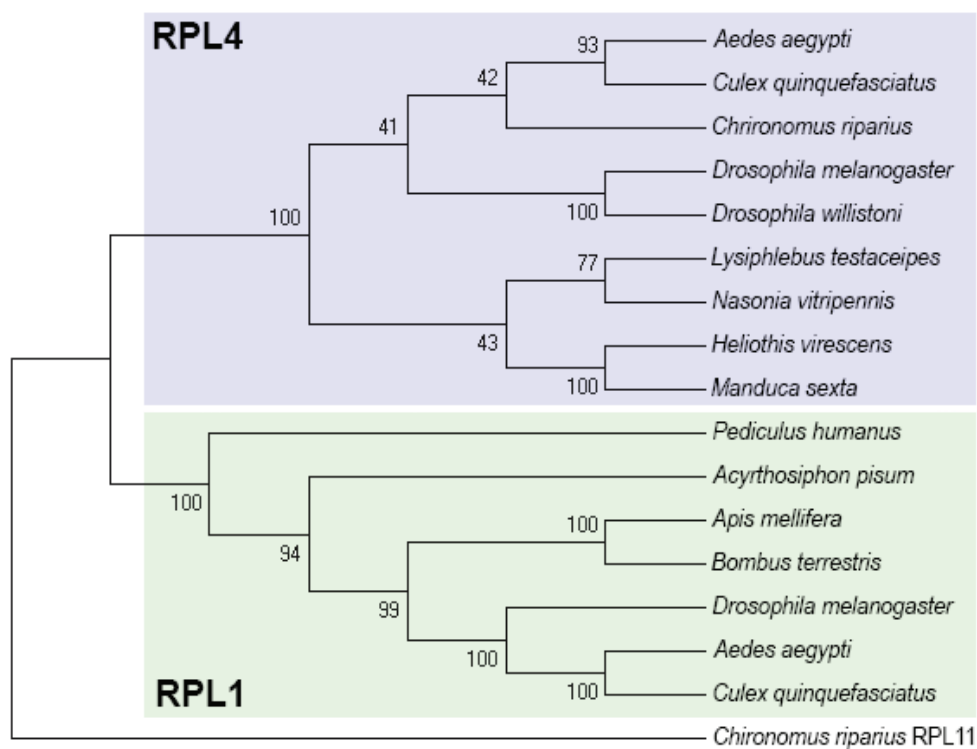


FIGURA 15. Árbol filogenético construido en base a los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RPLI y RPL4 en distintas especies de insectos. Se aprecia una clara divergencia, con dos grupos bien establecidos que se corresponden con las proteínas RPLI y RPL4 respectivamente. Como grupo externo se tomó la secuencia de la proteína RPLI I de *C. riparius*.

## I.2.2. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS GÉNICOS OBTENIDOS

Una vez diseñados los oligonucleótidos, para comprobar su especificidad y obtener las secuencias de los correspondientes genes en nuestra especie de estudio, se amplificaron todos los fragmentos génicos mediante RT-PCR a partir de ARN total de larvas de *C. riparius*. Todos los fragmentos fueron posteriormente clonados y secuenciados para verificar que se correspondían con los fragmentos de los dos genes esperados. La secuencia obtenida en ambos casos mostró una elevada similitud con los genes homólogos de las especies de artrópodos utilizadas en los alineamientos, lo que aseguró, en el caso del gen *hsp10*, la especificidad de los oligonucleótidos seleccionados para su posterior utilización en las amplificaciones por PCR. En la Tabla 14 se muestran los tamaños de los fragmentos obtenidos finalmente y el porcentaje máximo de identidad encontrado en las bases de datos. Las secuencias de los fragmentos clonados de los distintos genes se muestran en la Tabla 14.

Gen	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Máximo de identidad en artrópodos (%)
<i>hsp10</i>	127	98 ( <i>Chironomus tentans</i> )
<i>rpL4</i>	149	82 ( <i>Anopheles gambiae</i> )

TABLA 14. Tamaño de los fragmentos amplificados y porcentajes máximos de identidad de proteína encontrados en artrópodos para los dos genes seleccionados en el estudio con *C. riparius*.

Gen	Secuencia
<i>hsp10</i>	5' GGAATTGTGATTCCAGAGAAGGCACAATCAAAGGTCTTAAGA GCCACAGTTATTGCTTGCGGTCCAGGAGCCAGAAATCAGAAA GGAGAATACATCAAGATGGGAGTCTCTGTAGGAGATCAAGTCC 3'
<i>rpL4</i>	5' AACGCTTCAGAGCTGGACGTGGTAAAATGCGTGATCGTCGTC GTATCCAACGTCGTGGACCATTGATTGTTTACTCAAAGGATG ATGGTTTACGTCGTGCATTCCGTAATATTCCAGGCGTTGACA CAATGAGCGTACACAAGATGAAT 3'

TABLA 15. Secuencias de los dos nuevos fragmentos génicos identificados en *C. riparius*.

## 2. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LABORATORIO

### 2.1. DEHP

#### 2.1.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

Con el objetivo de evaluar la toxicidad del DEHP y seleccionar el rango de concentraciones a emplear en las pruebas moleculares, se analizó en primer lugar la supervivencia de larvas de *Chironomus riparius* expuestas a dosis crecientes de este compuesto durante distintos tiempos.

El rango de concentraciones analizado en las exposiciones agudas de 24 horas estuvo entre  $10^{-3}$  y  $10^5 \mu\text{g l}^{-1}$ . Estas concentraciones recogen holgadamente los valores máximos y mínimos detectados en diferentes escenarios de exposición y recogidos en la literatura (Fromme y col., 2002; Clark y col., 2003; ECB, 2008). Dado que las distintas diluciones empleadas del compuesto se prepararon en etanol, se emplearon como control larvas mantenidas en medio de cultivo fresco con la concentración de etanol usada en los tratamientos, que fue del 1% y que en comprobaciones rutinarias en nuestro laboratorio no mostraron ninguna alteración en las dianas de toxicidad estudiadas.

Los resultados de supervivencia obtenidos aparecen reflejados en la Figura 16. Como se puede apreciar en la gráfica correspondiente a una exposición de 24 horas, ninguna de las concentraciones de DEHP resultó significativamente tóxica para las larvas.

A pesar de que tras 24 horas de exposición a DEHP no se observó mortalidad significativa, obteniéndose valores cercanos al 100% en la supervivencia de las larvas, en todos los experimentos realizados en estas condiciones se apreció una pérdida generalizada de movilidad y coloración de los individuos en concentraciones superiores a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ .

En base a los resultados obtenidos tras 24 horas de exposición, para exposiciones agudas más largas (hasta 96 horas) y para los estudios de toxicidad retardada (24 horas de exposición más 24 horas en medio de cultivo fresco) se emplearon únicamente las concentraciones más bajas, hasta  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ . En estas condiciones los valores de supervivencia en cualquiera de los tiempos estudiados fueron siempre cercanos al 100%, no encontrando en ningún caso diferencias significativas con respecto a las larvas utilizadas como control.

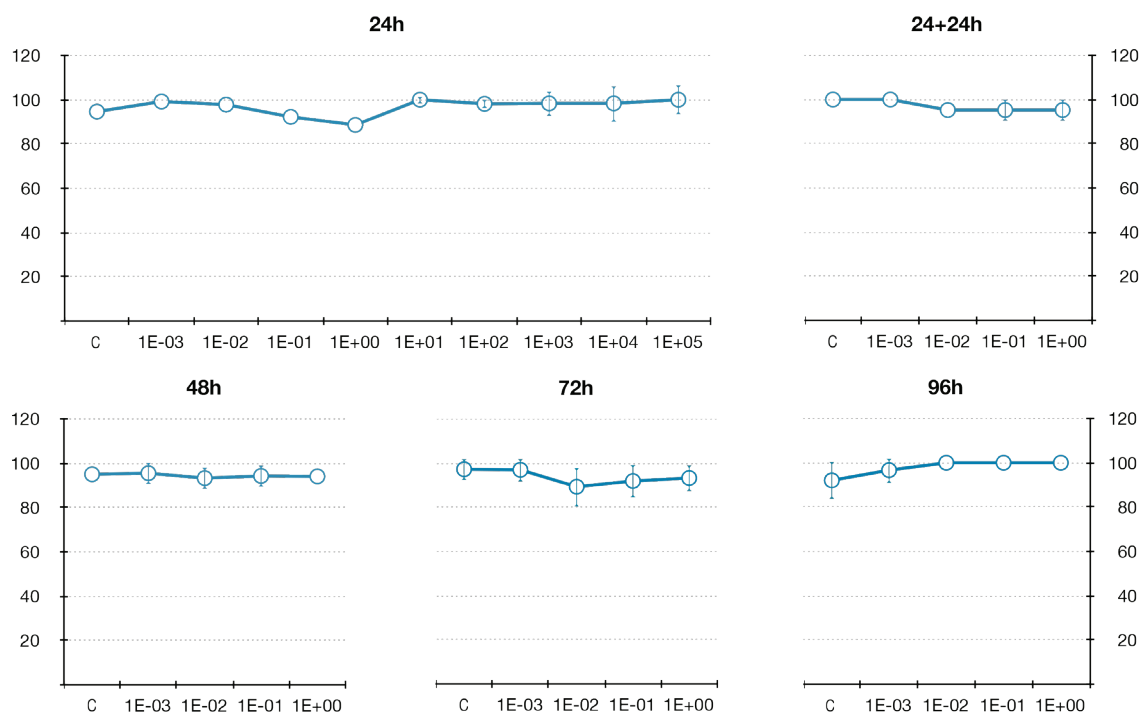


FIGURA 16. Análisis de la supervivencia de larvas de *C. riparius* tras exposiciones a dosis crecientes de DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: porcentaje de supervivencia ( $M \pm SE$ ). No existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

## 2.1.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES

### 2.1.2.1. ESTUDIOS A 24H

Como una primera aproximación al efecto que el DEHP pudiera provocar sobre las rutas moleculares seleccionadas para el estudio, se eligieron algunos genes representativos de cada ruta, utilizados comúnmente en nuestro laboratorio como potenciales biomarcadores de efecto temprano a tóxicos. El estudio se centró en el análisis de los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la biogénesis ribosómica (en concreto se evaluó el ARN ribosómico de nueva síntesis, a través del espaciador intergénico *ITS2*), la respuesta general a estrés (*hsp70*, *hsc70* y *hsp40*), la ruta hormonal mediada por ecdisona (*EcR*) y el metabolismo energético (*GAPDH*). Los resultados se muestran en la Figura 17.

La expresión génica tras 24 horas de exposición a DEHP se analizó en concentraciones crecientes de este compuesto, entre  $10^{-3}$  y  $10^5$   $\mu\text{g l}^{-1}$ . Los distintos tratamientos se llevaron a cabo de manera independiente y conjuntamente con un grupo de larvas no expuestas que se empleó como control. Para cada caso, se extrajo el ARN total de las larvas y se obtuvo su copia de ADNc, a partir del cual se amplificaron los fragmentos de los distintos genes mediante PCR. Se seleccionaron como control interno o genes de referencia dos genes constitutivos para los cuales se constató la estabilidad de sus niveles de expresión. En el análisis del ARN prerribosómico se utilizó como control interno un fragmento del gen que codifica para ARNr 26S. En el estudio de los restantes genes se empleó un fragmento de 201 pb del gen de la actina.

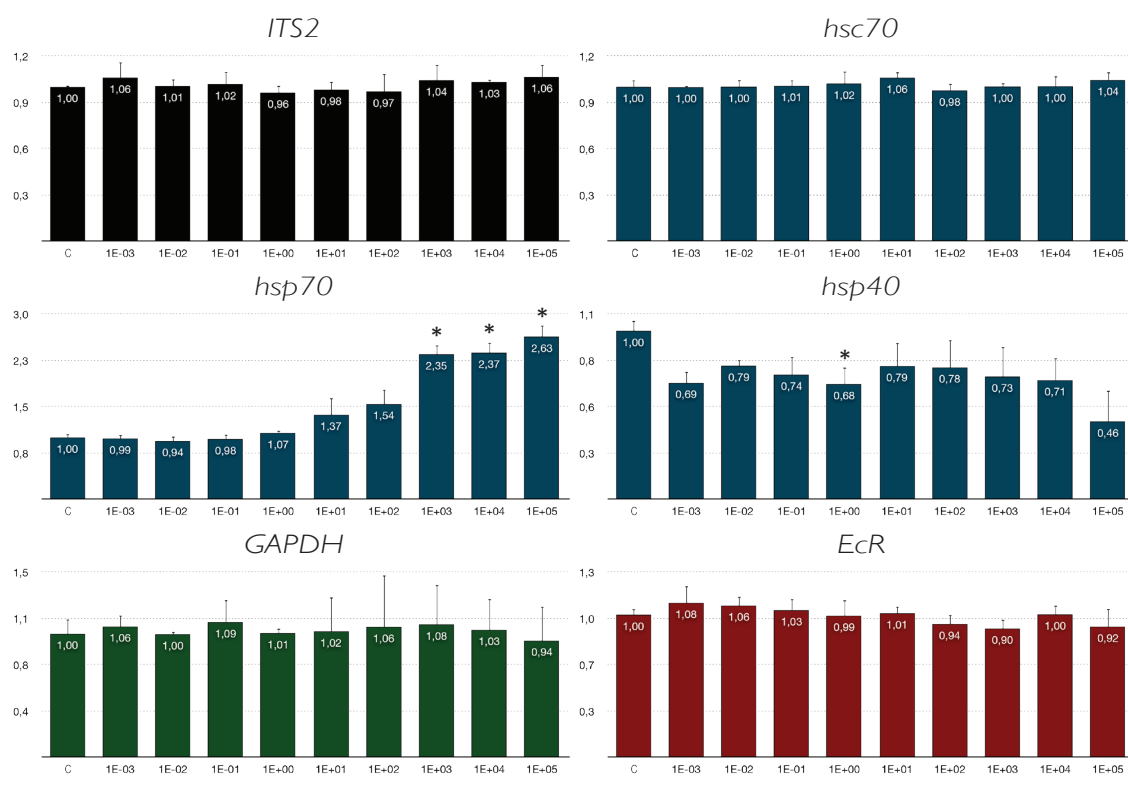


FIGURA 17. Análisis de la expresión génica de larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24 horas. Efectos sobre la síntesis de ARN prerribosómico (*ITS2*), la respuesta celular a estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*), el metabolismo celular (*GAPDH*) y la ruta hormonal de la ecdisona (*EcR*). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Las dosis agudas y subletales de DEHP utilizadas en esta primera evaluación no afectaron a los niveles de ARN prerribosómico, pudiéndose interpretar este hecho como una ausencia de efectos adversos de este compuesto a las dosis y tiempos estudiados sobre la funcionalidad del nucléolo, entendida en este caso como la capacidad de síntesis de ARNr.

Sin embargo, en relación a la respuesta de estrés, el DEHP provocó un aumento significativo en los niveles de transcrito del gen *hsp70* en las tres concentraciones más altas analizadas tras 24 horas de exposición. Esto refleja la participación de este gen en la respuesta desencadenada por estrés celular por el efecto tóxico del compuesto. Cabe destacar que esta inducción en los niveles de transcrito fue notablemente inferior a la provocada por choque térmico (2 horas a 35 °C), evaluada en anteriores ocasiones en nuestro laboratorio y en la cual los niveles de transcrito de *hsp70* se incrementan hasta cuatro veces respecto a larvas no tratadas. Contrariamente, la forma constitutiva de este gen (*hsc70*) no mostró variación alguna en sus niveles de expresión como respuesta a las dosis de DEHP ensayadas.

El gen *hsp40* tampoco mostró cambios significativos en sus niveles de expresión como respuesta al compuesto, si bien se observó una tendencia al descenso de su actividad transcripcional, que como media rondó el 30% por debajo de los valores del control. Esto puede ser debido a su importante participación en procesos de plegamiento de proteínas, lo que podría considerarse una actividad constitutiva de este gen.

Respecto a los otros procesos analizados, la ruta endocrina y el metabolismo celular, los resultados obtenidos no mostraron variaciones significativas en los niveles de ARNm de los genes *EcR* y *GAPDH*. *A priori*, estos resultados parecen indicar que exposiciones agudas de las larvas a DEHP, en las condiciones utilizadas en este estudio, no producen ningún efecto reseñable en dichas rutas, al menos en lo que respecta a los genes evaluados.

## 2.1.2.2. ESTUDIOS A TIEMPOS LARGOS

A la vista de los resultados obtenidos tras la exposición de larvas a dosis subletales de DEHP durante 24h, se decidió alargar los tiempos de las exposiciones con el fin de intentar detectar alguna diana de efecto del compuesto. Para llevar a cabo el estudio de las rutas moleculares seleccionadas a tiempos largos, se emplearon únicamente las concentraciones más bajas de todas las evaluadas a 24 horas, desde  $10^{-3}$  a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Según los genes, los estudios de toxicidad aguda se prolongaron hasta las 48 horas o incluso hasta las 96 horas. Además, para todos los genes analizados se llevaron a cabo estudios de toxicidad retardada (recuperación) en los que tras 24 horas de exposición al compuesto se mantuvieron las larvas 24 horas más en medio de cultivo fresco sin droga.

### Efectos sobre la biogénesis ribosómica

Dado que los niveles de ARN prerribosómico se mostraron muy estables en los ensayos con DEHP a tiempos cortos, el estudio de los efectos del compuesto sobre la biogénesis de los ribosomas a tiempos largos se centró exclusivamente en el análisis a nivel molecular de la actividad de los genes que codifican para algunas proteínas ribosómicas, en concreto *rpL4* y *rpL13* (Figura 18). Se expusieron larvas a dosis crecientes de DEHP, desde  $10^{-3}$  a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , durante tratamientos que en algunos casos se prolongaron hasta las 96 horas. Como control interno se utilizó un fragmento de 201 pb del gen de la actina.

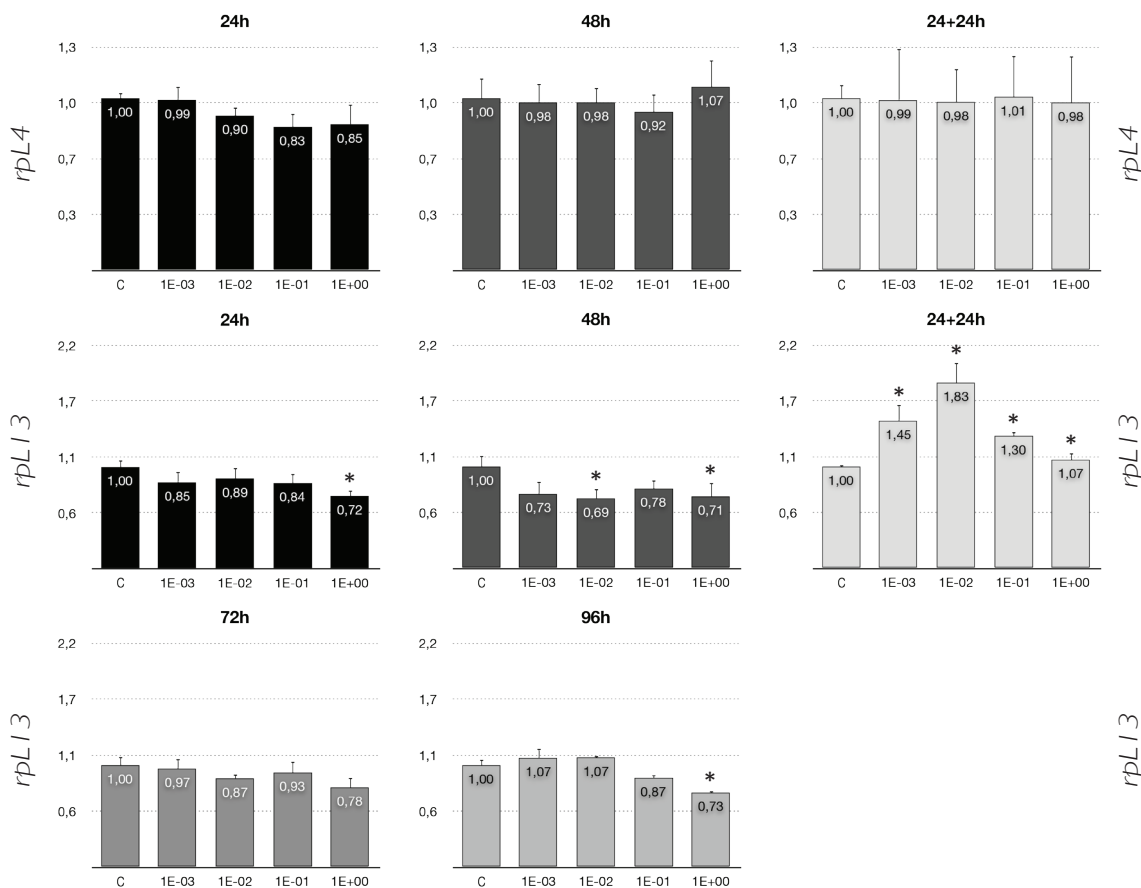


FIGURA 18. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los ribosomas (*rpL4*, *rpL13*) en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y/o 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados tras 48 horas de exposición a DEHP no mostraron ningún efecto sobre la expresión del gen *rpl4*, mientras que permitieron detectar una disminución en los niveles de transcrito de *rpl13*. Esta variación, aunque no resultó estadísticamente significativa, supuso un descenso aproximado del 30% respecto a la expresión del gen en ausencia de tratamiento. Este descenso sí resultó estadísticamente significativo tras 96 horas de exposición a la dosis más alta ensayada.

Las pruebas de recuperación tampoco mostraron efectos sobre la expresión del gen *rpl4*. Sin embargo, en el caso del gen *rpl13*, tras exponer las larvas a DEHP durante 24 horas y mantenerlas 24 horas más en un medio sin droga se produjo un aumento significativo de la expresión, contrario a la represión detectada en las exposiciones largas.

### **Efectos sobre la respuesta celular a estrés**

El estudio del patrón de respuesta de estrés en presencia de DEHP se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de fragmentos correspondientes a los genes de estrés *hsc70*, *hsp70*, *hsp40* y *hsp27*, a partir del ADNc obtenido por retrotranscripción. Como control interno se utilizó un fragmento del gen de la actina.

Los resultados se muestran en la Figura 19 y reflejan un comportamiento diferente entre la forma inducible de la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) y su correspondiente forma constitutiva (*hsc70*). Tras 48 horas de tratamiento el DEHP provocó un evidente descenso en los niveles de expresión de la forma inducible *hsp70*, llegando a disminuir un 30% respecto al valor del control. Esta represión de la expresión se agravó en los tiempos más largos estudiados, 72 y 96 horas, siendo estadísticamente significativa en todas las dosis estudiadas y llegando a rozar en esas condiciones valores del 70% por debajo del control. Cabe destacar que este efecto del DEHP sobre la expresión del gen *hsp70* es dependiente de tiempo en estas concentraciones. En contraposición, tras 48 horas de exposición al compuesto los niveles de transcrito de *hsc70* permanecieron sin variaciones significativas, lo que corrobora la actividad constitutiva de este gen, que se expresa en condiciones de normalidad y no parece alterado en situaciones de estrés. Por otro lado, mientras *hsc70* volvió a mostrarse muy estable en los estudios de toxicidad retardada, la retirada del tóxico provocó un fuerte incremento en los niveles de *hsp70*, llegando a ser de más de cinco veces por encima del valor del control.

Por otra parte, la exposición a DEHP provocó una activación significativa y retardada del gen *hsp40* en todas las concentraciones analizadas, aunque no de *hsp27* que, sin embargo, resulta ligeramente activado en presencia del tóxico pero vuelve a alcanzar rápidamente niveles normales al eliminar el compuesto del medio.



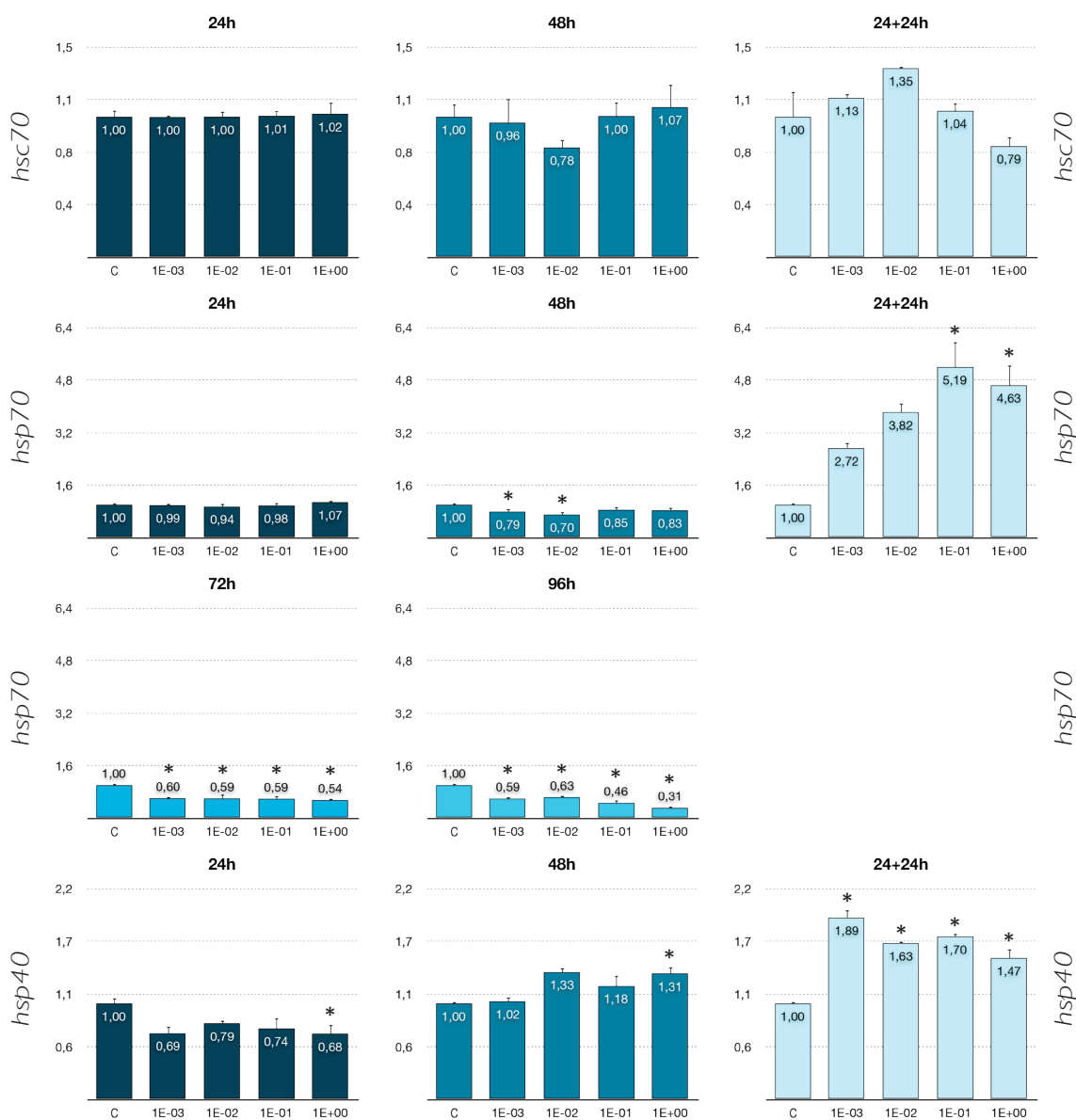


FIGURA 19. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*) en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y/o 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

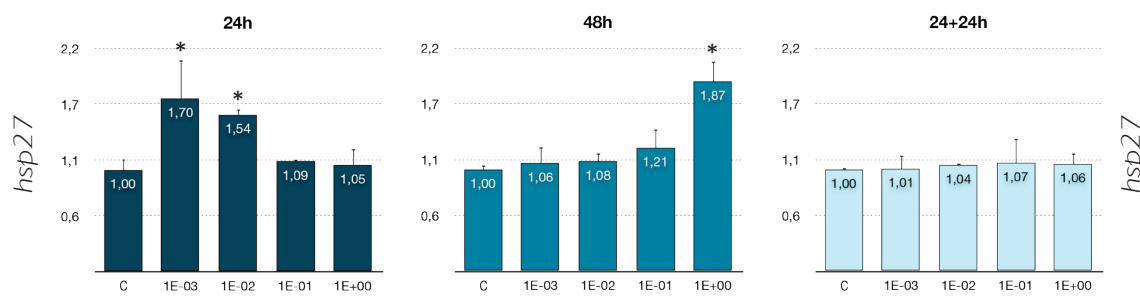


FIGURA 19. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*) en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y/o 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración (µg l<sup>-1</sup>). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). \* Diferencias significativas (p ≤ 0.05).

### Efectos sobre la ruta hormonal

El gen *EcR*, de la ruta hormonal de la ecdisona, fue estudiado en tiempos largos tras la exposición a DEHP (Figura 20). Aunque este gen no mostró variaciones en sus niveles de expresión en ninguna de las concentraciones analizadas a las 24 horas de tratamiento (Figura 17), exposiciones más prolongadas evidenciaron un significativo descenso de los mismos a partir de las 48 horas, llegando a alcanzar valores del 70% por debajo de los niveles del control tras 72 horas y manteniéndose con esta tendencia a las 96 horas en contacto con el compuesto. Por tanto, el DEHP provoca una notable inhibición del gen del receptor de la ecdisona a partir de las 48 horas en todas las concentraciones ensayadas.

Esta represión significativa se mantuvo asimismo en los estudios de toxicidad retardada, donde se puso de manifiesto la incapacidad de las larvas de volver a alcanzar los valores de expresión de los controles tras las 24 horas de recuperación en medio de cultivo sin droga, alcanzándose valores cercanos al 50% por debajo de los del control. Este resultado es contrario a los obtenidos para los demás genes estudiados, en los que los estudios de toxicidad retardada arrojaron valores similares a los del control o por encima de ellos, 24 horas después de retirado el tóxico del medio.

Los datos sugieren que en *Chironomus riparius* se produce un efecto específico del DEHP sobre el gen *EcR* de la ruta endocrina. Cabe recordar aquí los resultados obtenidos con *hsp70*, ya que ambos genes presentan una disminución drástica y significativa en sus niveles de transcrito en el estudio a tiempos largos con este compuesto. Teniendo en cuenta la relación de HSP70 con los procesos de plegamiento del *EcR*, la disminución de

la actividad de ambos genes podría estar relacionada. Sin embargo, la fuerte activación retardada del gen *hsp70* no conlleva un comportamiento similar en el gen *EcR*.

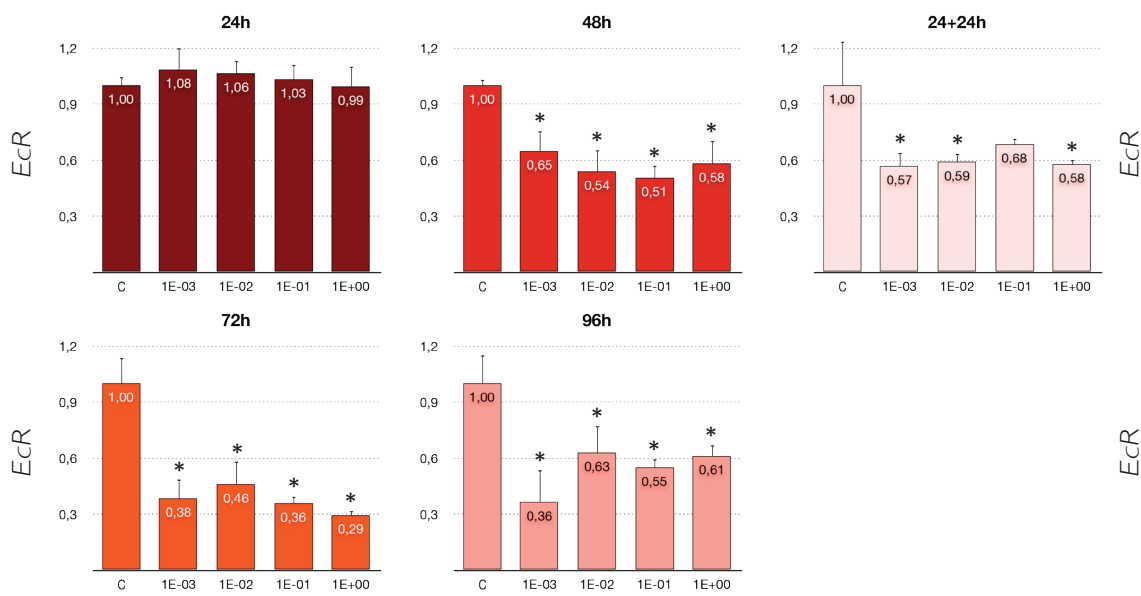


FIGURA 20. Análisis de la expresión del gen *EcR*, relacionado con la ruta hormonal de la ecdisona, en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración (µg l⁻¹). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### Efectos sobre el metabolismo energético

Los posibles efectos sobre el metabolismo energético de exposiciones prolongadas a DEHP se analizaron mediante la medida de la actividad transcripcional del gen *GAPDH*, que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Figura 21).

Tras unas primeras 24 horas de exposición sin efectos destacables, se apreció desde las 48 horas una tendencia a la disminución de los niveles de expresión del gen, que resultaron estadísticamente significativas en todas las concentraciones estudiadas a partir de las 72 horas, llegando a producirse una represión casi absoluta a las 96 horas de exposición a DEHP. La interpretación de este resultado es interesante, dado que *GAPDH* está involucrada en los procesos metabólicos de obtención de energía a través de la glucólisis. La casi total inhibición que se produce en este gen en exposiciones prolongadas podría suponer un grave problema de déficit energético para las células de los individuos expuestos.

Los estudios tras 24 horas de exposición y 24 más de recuperación mostraron un comportamiento inalterable en el este gen, sin diferencias con respecto a los valores del control o de los tratamientos de 24 horas.

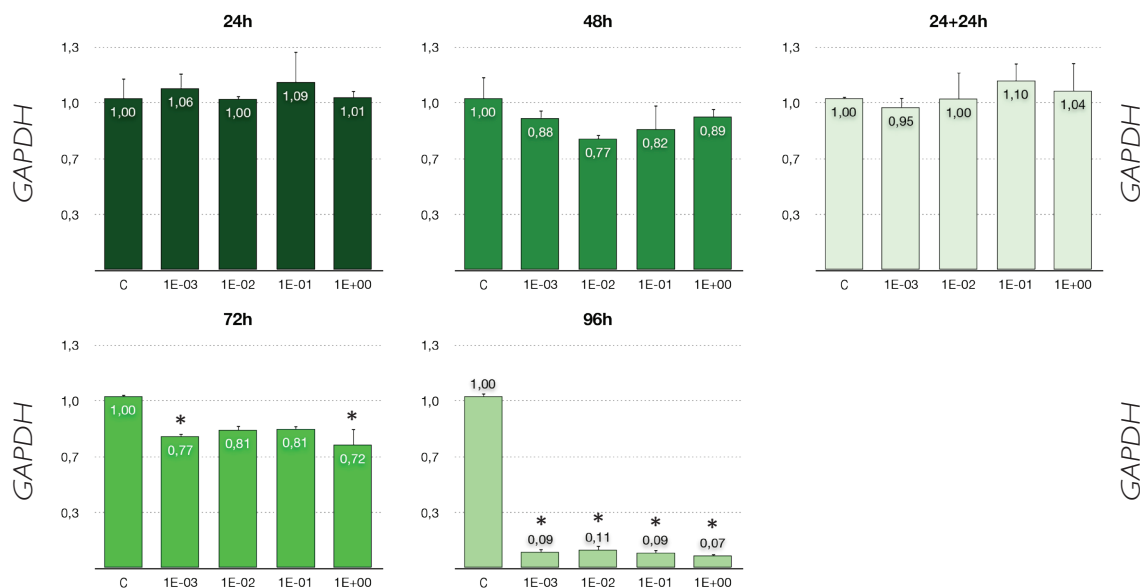


FIGURA 21. Análisis de la expresión del gen *GAPDH*, relacionado con el metabolismo celular; en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración (µg l⁻¹). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### Efectos sobre el metabolismo de detoxificación

La posible alteración de los procesos de detoxificación celular se evaluó mediante el análisis de la actividad transcripcional del gen *CYP450*, que codifica para la enzima citocromo P450 (Figura 22). Esta enzima es una pieza clave dentro de los procesos de biotransformación, al igual que la enzima GST, cuyo análisis se llevó a cabo mediante el estudio de su actividad (Figura 23).

La disminución de los niveles de transcrito de *CYP450* se apreció ya tras las primeras 24 horas de tratamiento y se mantuvo a las 48 horas. La represión de este gen a las 96 horas fue notable y rozó valores cercanos al 50% respecto al control. La misma tendencia se observa a las 72 horas, aunque debido a la dificultad puntual para aumentar el tamaño de la muestra en esas condiciones experimentales los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas.

Al analizar tras 24 horas de recuperación las larvas expuestas 24 horas, los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo de la expresión del gen *CYP450* en todas las concentraciones analizadas, en una relación inversamente proporcional a la concentración de DEHP. Dado que el gen *CYP450* está relacionado con la Fase I del proceso de detoxificación celular, su aumento indica la activación de mecanismos de eliminación de xenobióticos que, una vez retirado el tóxico, restablecerían la situación metabólica normal.

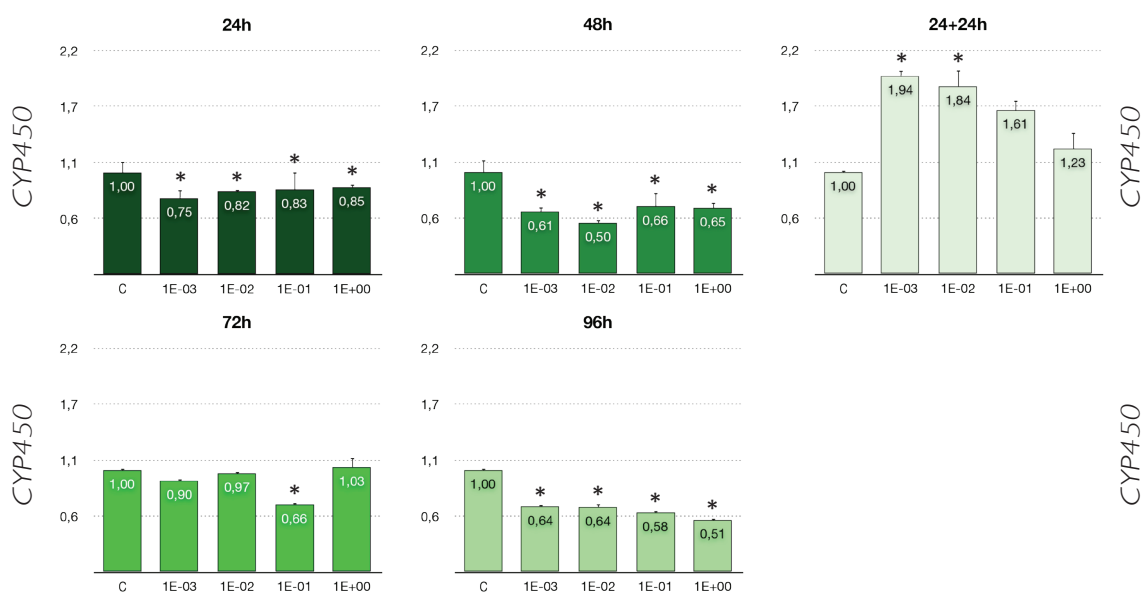


FIGURA 22. Análisis de la expresión de *CYP450*, gen relacionado con el metabolismo de detoxificación, en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24, 48, 72 y 96 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Para evaluar los efectos del DEHP sobre la ruta de detoxificación celular, se analizó también la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa. En este caso, como primera aproximación, el ensayo se llevó a cabo en larvas de estadio IV de *C. riparius* expuestas a dos concentraciones de este compuesto:  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Se llevaron a cabo tanto exposiciones agudas de 24 y 48 horas como estudios de toxicidad retardada, con 24 horas de exposición y 24 horas más de recuperación en medio fresco sin droga.

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia muy similar para las dos concentraciones analizadas (Figura 23), no viéndose afectada esta actividad en las primeras 24 ho-

ras de tratamiento y detectándose posteriormente un descenso parejo y significativo de la misma en las exposiciones de 48 horas y en los experimentos de toxicidad retardada.

Los citocromos P450 constituyen uno de los principales grupos de enzimas implicados en la Fase I de los procesos de detoxificación, al igual que las GSTs lo son en la Fase II. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento similar de ambos sistemas y sugieren la capacidad del DEHP de alterarlos, mermando la capacidad de adaptación de estos organismos.

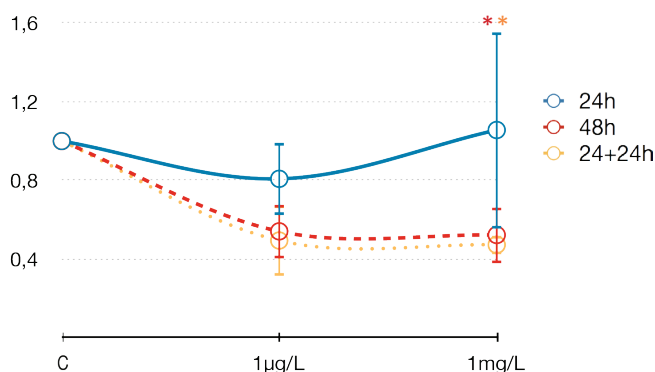


FIGURA 23. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en larvas de *C. riparius* expuestas a DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración (µg l<sup>-1</sup>). Ordenadas: actividad relativa (M ± SE). \* Diferencias significativas (p ≤ 0.05).

### 2.1.2.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL DEHP

- La exposición a DEHP no altera las tasas de supervivencia de las larvas acuáticas de *C. riparius* en ninguna de las condiciones ensayadas.
- El tratamiento de las larvas con DEHP no parece afectar de manera significativa a ninguno de los componentes esenciales de la biogénesis de los ribosomas (ARNr y proteínas ribosómicas RPL4, RPL11 y RPL3), si bien en la recuperación tras la exposición se produce una activación específica del gen *rpl13*.
- El DEHP es capaz de provocar una activación específica del gen *hsp70* a tiempos cortos de exposición, frente a la notable estabilidad de otros genes. Sin embargo, exposiciones prolongadas al compuesto inducen una represión significativa de la actividad de *hsp70*, alcanzando valores del 50% por debajo de los niveles del control. En condiciones de recuperación tras una exposición breve, se produce una notable activación del gen *hsp70*, así como del gen *hsp40*.
- En cuanto al efecto sobre el receptor hormonal, no se aprecian cambios significativos en la expresión del gen *EcR* en las primeras horas de exposición. Sin embargo, se produce una disminución significativa de la actividad transcripcional a partir de las 48 horas de exposición, que se mantiene en torno al 50% por debajo de los niveles del control tras cuatro días de exposición. A diferencia del resto de los genes analizados, este gen permanece inhibido incluso 24 horas después de la retirada del tóxico.
- Los resultados del estudio sobre metabolismo celular reflejan un efecto claro del DEHP sobre las dos rutas analizadas. Este compuesto no parece afectar al gen *GAPDH*, clave en el metabolismo energético; no obstante, tras cuatro días de exposición continuada se observa una drástica represión del mismo, con una inhibición casi total de su actividad.
- Respecto a la ruta de detoxificación, los resultados indican una tendencia similar en los dos sistemas estudiados, con descensos significativos tanto de la actividad transcripcional del gen *CYP450* como de la actividad de la enzima GST. Sin embargo, la actividad del gen *CYP450* se restablece rápidamente en ausencia del tóxico.

## 2.2. BBP

### 2.2.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

En los estudios sobre la toxicidad del BBP se analizó en primer lugar la supervivencia de larvas de estadio IV de *Chironomus riparius* expuestas durante distintos tiempos a dosis crecientes de este compuesto. Como control se emplearon también larvas mantenidas en medio de cultivo fresco con una concentración del 1% de etanol, usado como solvente del compuesto. El rango de concentraciones analizado en las exposiciones agudas de 24 horas estuvo también entre  $10^{-3}$  y  $10^5 \mu\text{g l}^{-1}$ , quedando de nuevo recogidos los valores máximos y mínimos detectados en diferentes escenarios de exposición según la literatura (Fromme y col., 2002; Clark y col., 2003; ECB, 2007).

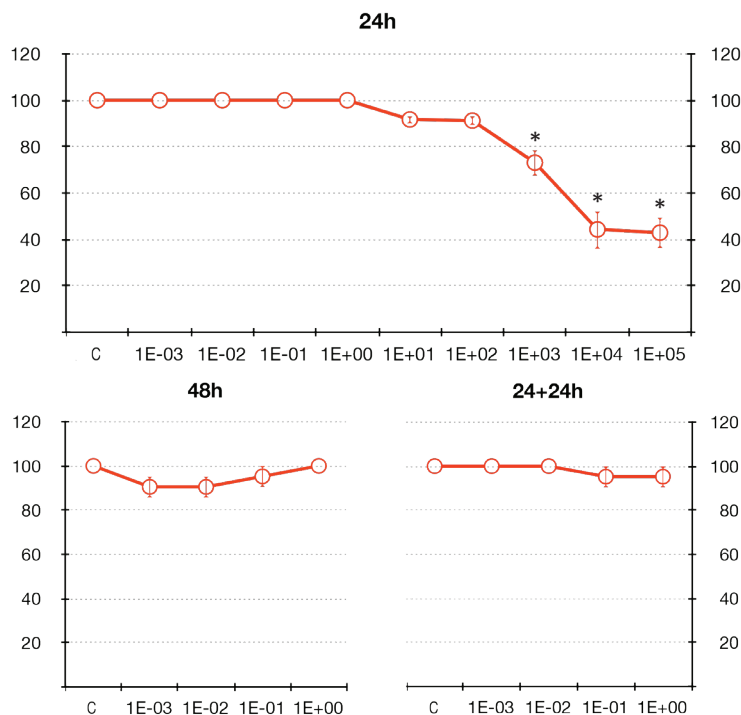


FIGURA 24. Análisis de la supervivencia de larvas de *C. riparius* tras exposiciones a dosis crecientes de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: porcentaje de supervivencia ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



Los resultados de supervivencia obtenidos aparecen reflejados en la Figura 24 y muestran un claro efecto dependiente de dosis sobre la supervivencia de las larvas expuestas a BBP durante 24 horas. Como se puede apreciar en la gráfica correspondiente a este tiempo, las concentraciones más altas analizadas de BBP resultaron significativamente tóxicas y redujeron la supervivencia de las larvas hasta un 43% aproximadamente, obteniéndose mediante análisis Probit un valor de LC50 de  $2.66 \cdot 10^4 \mu\text{g l}^{-1}$ . Estos datos muestran una mayor toxicidad del BBP con respecto al DEHP en términos de supervivencia.

Para el análisis de los efectos a tiempos largos sólo se ensayaron las concentraciones más bajas del compuesto, entre  $10^{-3}$  y  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , en las que los valores de supervivencia fueron siempre cercanos al 100%.

## 2.2.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES

### 2.2.2.1. ESTUDIOS A 24H

Siguiendo la misma aproximación experimental que la comentada en el caso del DEHP, con el objeto de detectar posibles alteraciones que el BBP pudiera provocar sobre las rutas celulares seleccionadas en este trabajo, se eligieron algunos genes como potenciales biomarcadores. Dada la escasez de información bibliográfica sobre los efectos de este compuesto en invertebrados, en especial en *Chironomus*, el número de genes seleccionados para la evaluación de cada una de las rutas fue mayor que en el caso del DEHP. El estudio se centró en el análisis de los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la biogénesis ribosómica (en concreto se evaluaron el ARN ribosómico de nueva síntesis, a través del espaciador intergénico *ITS2*, y genes codificantes para las proteínas ribosómicas *RPL4*, *RPL11* y *RPL13*), la respuesta general a estrés (*hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp27* y *hsp10*), la ruta hormonal (*EcR* y *ERR*), el metabolismo energético (*GAPDH*) y la capacidad de detoxificación (*CYP450*).

La expresión génica tras 24 horas de exposición a BBP se analizó también en concentraciones crecientes de este compuesto, entre  $10^{-3}$  y  $10^5 \mu\text{g l}^{-1}$  (Figura 25). Para ello, las larvas fueron expuestas independientemente a las distintas condiciones experimentales, llevando en paralelo los controles pertinentes de larvas mantenidas en medio de cultivo fresco sin droga. Los estudios de expresión génica mediante PCR se realizaron a partir del ADNc, obtenido para cada muestra a partir de la extracción del ARN total de las larvas. Como controles internos se utilizaron un fragmento del gen que codifica para ARNr

26S, en el caso del análisis del ARN prerribosómico, y un fragmento de 201 pb del gen constitutivo de la actina, en el resto de los genes estudiados.

Los resultados relativos al efecto del BBP sobre la biogénesis de los ribosomas muestran una disminución significativa dependiente de dosis en los niveles de *ITS2* en las larvas expuestas a las dosis más elevadas de este compuesto. Esto supone un descenso en los niveles de ARNr no maduro (tamaños 45S y 32S) sintetizado tras los tratamientos y podría considerarse un efecto específico del BBP sobre la funcionalidad del nucléolo, entendida en este caso como la capacidad de síntesis de ARNr. Las dosis de BBP a las que se observan estos efectos coinciden con las que presentan una mortalidad significativa en los estudios de supervivencia, pudiendo ser una consecuencia de la inhibición de la síntesis de ribosomas, esenciales para la supervivencia de las células.

Respecto a las proteínas ribosómicas, el otro componente implicado en la formación de los ribosomas, los resultados mostraron también un descenso estadísticamente significativo en los niveles de transcrito del gen *rpL4* para la mayoría de las dosis estudiadas, alcanzando valores medios de un 70% respecto al control. Frente a estos cambios, la actividad de *rpL13* no sufrió alteraciones significativas. Las variaciones detectadas en un proceso fisiológico tan importante como es la expresión de los genes que codifican para determinadas proteínas ribosómicas pueden ser origen de importantes alteraciones que condicionen los niveles proteicos de la célula y, de nuevo, como en el caso de la síntesis del ARN ribosómico, condicionen la supervivencia celular.

El BBP desencadenó un claro efecto dependiente de dosis sobre la expresión de los genes *hsp70*, *hsp40* y *hsp27*, aunque diferente en cada caso. Los resultados que se muestran en la Figura 26 reflejan un aumento significativo de la expresión del gen *hsp70*, más de cuatro veces por encima de los valores del control en las concentraciones más altas. En este caso la subida de los niveles de expresión de este gen sí es comparable a la descrita en respuesta de choque térmico en nuestro laboratorio y, al igual que ocurría con el DEHP, refleja una respuesta de estrés celular desencadenada por la exposición a ftalatos. La intensidad de la activación del gen *hsp70* sería diferente en los dos ftalatos estudiados, siendo mayor en el caso del BBP. Ambos compuestos comparten también la ausencia de alteraciones en los niveles de transcrito de *hsc70*, que demostró una vez más la diferente respuesta de las variantes constitutiva e inducible de esta proteína bajo condiciones de estrés. Por otro lado, los resultados reflejan que la exposición a BBP provoca la represión del gen *hsp40*, con un descenso significativo en los niveles de expresión en casi todas las dosis estudiadas, que en las concentraciones más altas llegó a ser de un 70% por debajo de los valores control. Estos datos sugieren un efecto específico y dependiente de dosis del BBP sobre el gen

*hsp40*, que juega un importante papel en procesos constitutivos y vitales como es el correcto plegamiento de proteínas.

El estudio de los efectos sobre la respuesta de estrés se amplió mediante el análisis del patrón de expresión de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico de 27 y 10 kDa. En el caso del gen *hsp27*, la activación alcanzó valores significativos similares a los obtenidos con el gen *hsp70*. Sin embargo, el gen que codifica para la proteína mitocondrial HSP10 se vio ligeramente reprimido, aunque no de forma significativa, en todas las concentraciones altas estudiadas, no detectándose alteraciones significativas en las bajas.

Respecto a la ruta hormonal, los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión del gen que codifica para el receptor de la ecdisona (EcR) en las concentraciones más altas. Esta respuesta dependiente de dosis fue similar en el caso del gen del receptor relacionado con estrógenos (ERR), con la misma tendencia, aunque de manera más específica y significativa en el caso del gen del receptor de ecdisona.

En cuanto al estudio del metabolismo energético mediante el análisis de los niveles de expresión de *GAPDH*, la exposición a BBP no pareció provocar cambios reseñables en los valores de expresión de este gen.

Por último, tampoco se detectaron cambios en los niveles de expresión del gen *CYP450*, utilizado como marcador en el estudio de los procesos de biotransformación de Fase I que se desencadenan dentro de los mecanismos celulares de detoxificación. Estos resultados indican que, a las dosis y tiempo estudiados, el BBP no afecta al metabolismo energético ni a la capacidad de detoxificación, medidas por los genes biomarcadores seleccionados.

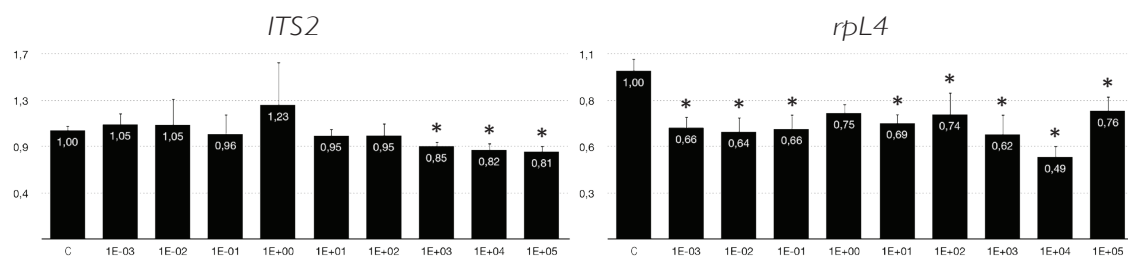


FIGURA 25. Análisis de la expresión génica de larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 horas. Efectos sobre la biogénesis de los ribosomas (*ITS2*, *rpl4*, *rpl13*), la respuesta celular a estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*, *hsp10*), la ruta hormonal de la ecdisona (*EcR*, *ERR*) y el metabolismo celular (*GAPDH*, *CYP450*). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

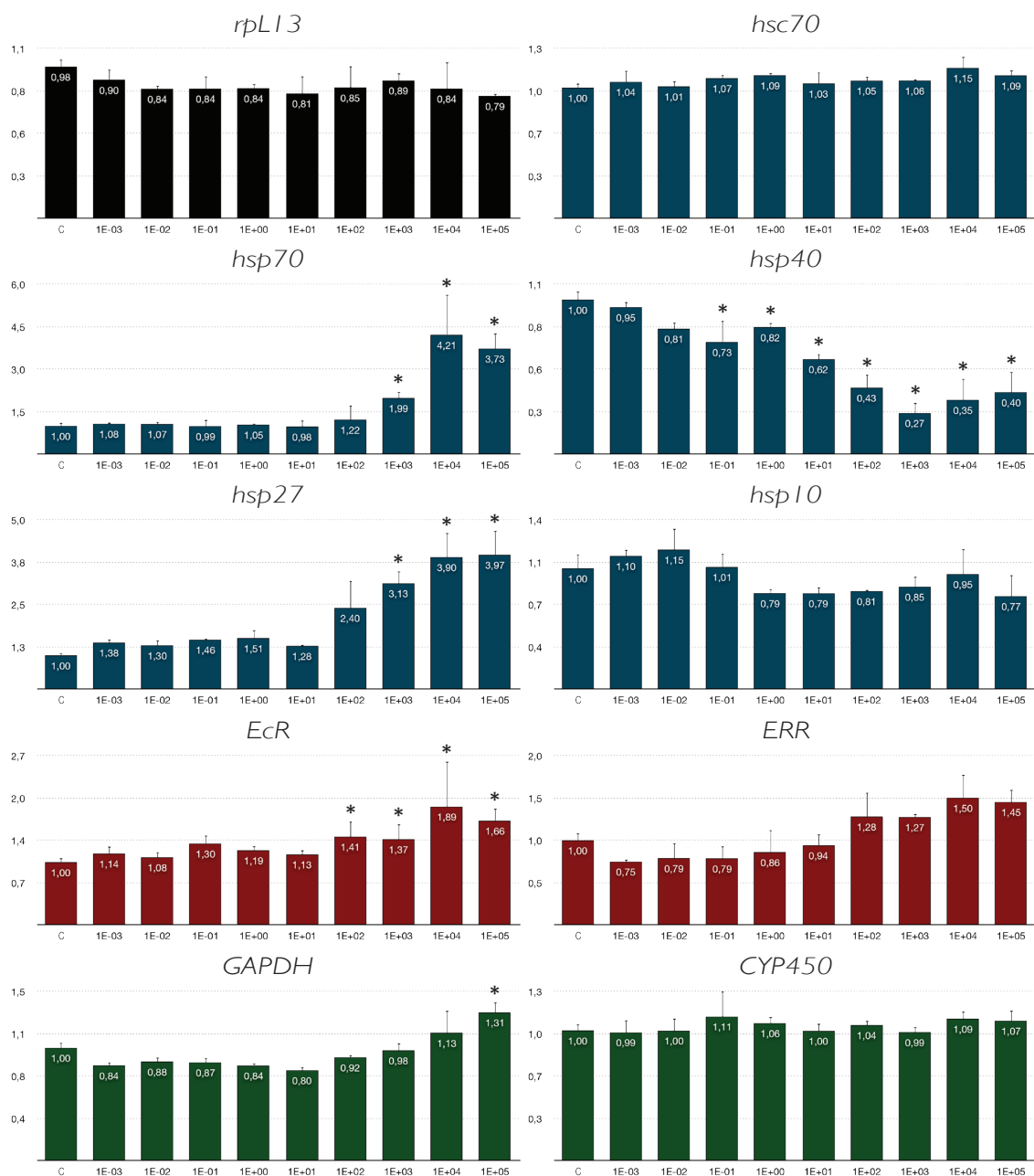


FIGURA 25. Análisis de la expresión génica de larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 horas. Efectos sobre la biogénesis de los ribosomas (*ITS2*, *rpL4*, *rpL13*), la respuesta celular a estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*, *hsp10*), la ruta hormonal de la ecdisona (*EcR*, *ERR*) y el metabolismo celular (*GAPDH*, *CYP450*). Abscisas: concentración (μg l⁻¹). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). \* Diferencias significativas (p ≤ 0.05).

## 2.2.2.2. ESTUDIOS A TIEMPOS LARGOS

Al igual que en el caso del DEHP, para el estudio de los efectos del BBP sobre la expresión génica a tiempos largos se seleccionaron únicamente las concentraciones más bajas, desde  $10^{-3}$  a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , y se prolongaron hasta las 48 horas. Además, también se llevaron a cabo estudios de toxicidad retardada, con 24 horas de exposición y 24 horas más de cultivo sin droga.

### **Efectos sobre la biogénesis ribosómica**

Tras la disminución dependiente de concentración observada en los niveles de *ITS2* y los niveles de transcrito de *rpl4* en exposiciones agudas a BBP, en el estudio de los efectos de este compuesto a tiempos largos se decidió ampliar el número de genes a analizar, incorporando la proteína ribosómica RPL11. Por tanto, el estudio de los efectos del BBP sobre la biogénesis de los ribosomas se centró en los genes *ITS2*, *rpl4*, *rpl11* y *rpl13*. Como control interno en el análisis de *rpl4* y *rpl13* se utilizó el gen de la actina. En el caso del gen *rpl11* y del espaciador intergénico *ITS2*, los estudios de expresión se llevaron a cabo mediante Real Time PCR, utilizando como genes de referencia *26S*, *hsc70*, *GAPDH* y actina.

Los resultados se muestran en la Figura 26 y reflejan alteraciones significativas en la actividad de los genes que codifican para las proteínas ribosómicas RPL4, RPL11 y RPL13. Tras 48 horas de tratamiento con BBP se observó una inhibición significativa de estos tres genes, alcanzando niveles hasta un 30% por debajo del control. Estos datos sugieren que a dosis bajas y tiempos largos de exposición el BBP afecta de forma evidente a la expresión de las proteínas ribosómicas, provocando una inhibición de la misma.

Sin embargo, de manera general, los resultados no mostraron alteraciones equiparables en los niveles de ARNr de nueva síntesis, analizados a través del espaciador intergénico *ITS2*, lo que sugiere que la exposición a BBP no parece afectar la transcripción del ADN ribosómico.

Las pruebas de toxicidad retardada mostraron que los niveles de expresión normal de los genes *rpl4* y *rpl13*, que habían sido inhibidos por BBP, se recuperan cuando se mantienen las larvas en un medio sin el tóxico.

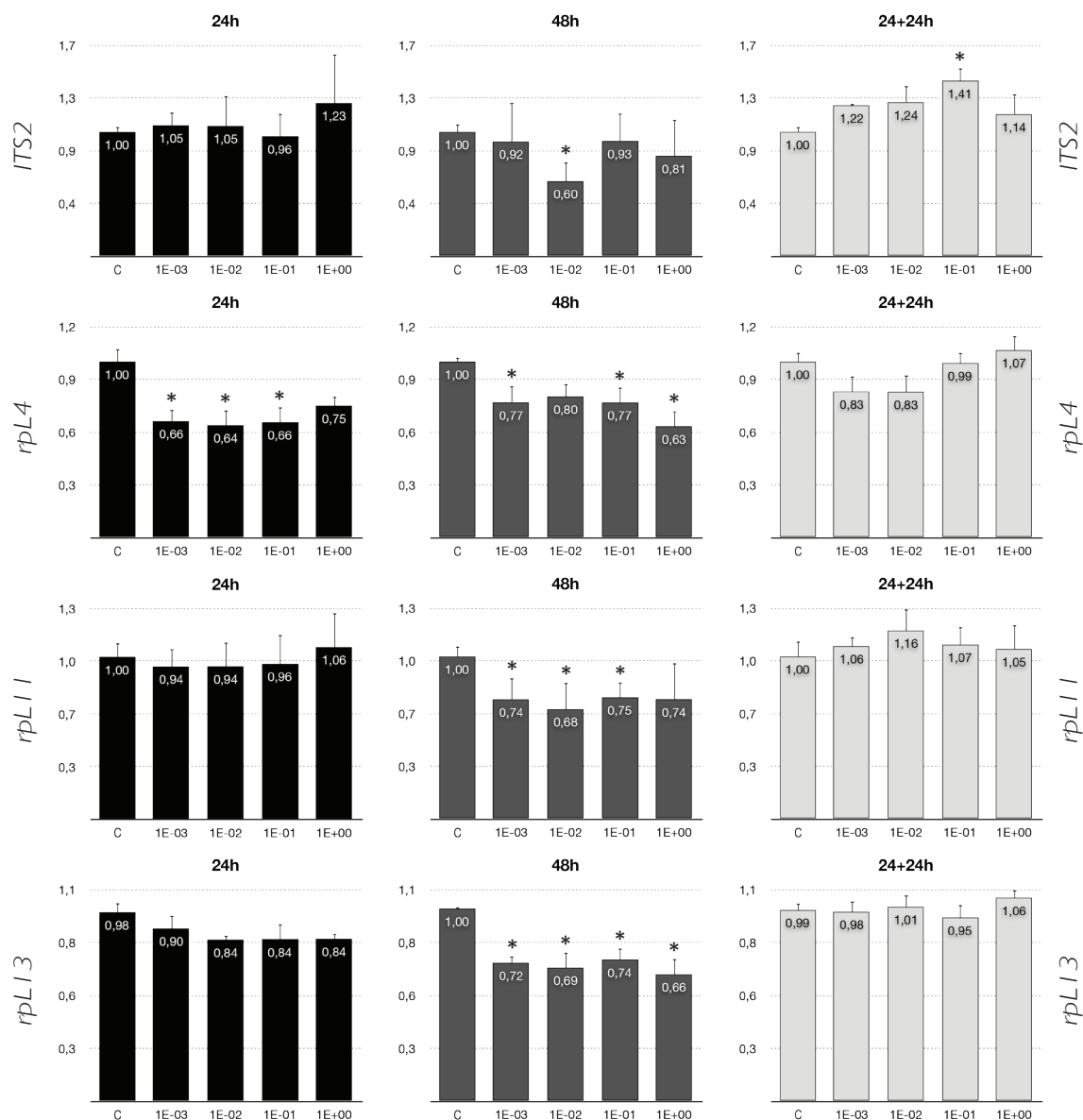


FIGURA 26. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los ribosomas (*ITS2*, *rpl4*, *rpl11*, *rpl13*) en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración (μg l<sup>-1</sup>). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). \* Diferencias significativas (p ≤ 0.05).

### Efectos sobre la respuesta celular a estrés

El estudio del patrón de respuesta de estrés en presencia de BBP se llevó a cabo analizando los niveles de transcrito de los genes *hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27* y *hsp10*, a partir del ADNc obtenido por retrotranscripción, utilizando como control interno actina. Los resultados se muestran en la Figura 27.

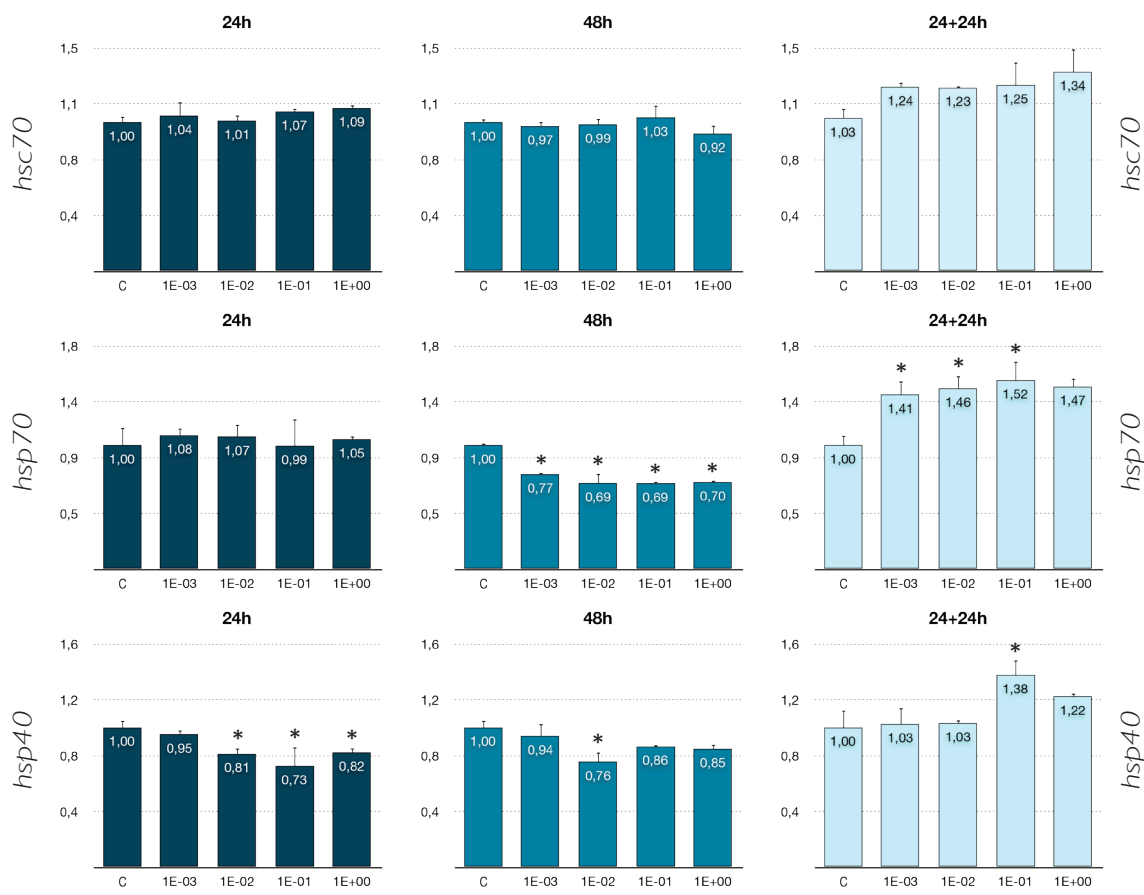


FIGURA 27. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*, *hsp10*) en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M  $\pm$  SE). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

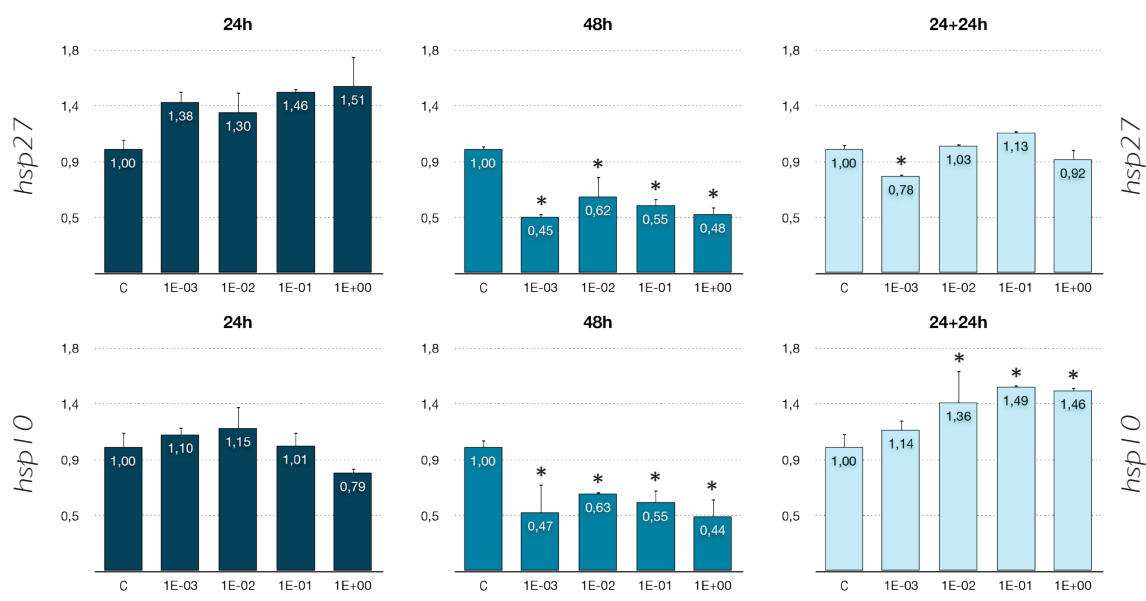


FIGURA 27. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsc70*, *hsp70*, *hsp40*, *hsp27*, *hsp10*) en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Estos resultados reflejan una represión significativa de los genes *hsp70*, *hsp40*, *hsp27* y *hsp10* provocada por la exposición a BBP. Cabe destacar, sin embargo, la estabilidad del gen *hsc70*, que no resulta afectado en ninguno de los tiempos ni condiciones ensayadas.

Tras 24 horas de tratamiento las larvas expuestas a BBP no mostraron alteraciones reseñables en la mayoría de los genes de estrés estudiados, excepto en el caso de *hsp40*, que sufrió un descenso significativo dependiente de dosis. Por el contrario, a las 48 horas se detectó un descenso estadísticamente significativo en la actividad de los genes codificantes para las proteínas de choque térmico de 70, 27 y 10 kDa, alcanzando respectivamente valores del 30%, el 55% y el 50% por debajo del control.

Respecto a la forma constitutiva de *hsp70*, al igual que ocurrió con el DEHP, el gen no mostró variaciones a las dosis y tiempos estudiados, lo que de nuevo pone de manifiesto el importante papel de su actividad constitutiva en la célula, no alterada en situaciones de estrés.

Los estudios de toxicidad retardada reflejaron la sobreexpresión de los genes *hsp70* y *hsp10* tras la retirada de la droga después de 24 horas de exposición.



### Efectos sobre la ruta hormonal

Tras comprobar en los tratamientos de 24 horas que las exposiciones a las concentraciones más altas de BBP desencadenaban un incremento en los niveles de expresión de los genes relacionados con hormonas esteroideas, de manera significativa en el caso del gen *EcR*, se evaluó la actividad de estos genes a dosis bajas y tiempos más largos de exposición. Los resultados que se muestran en la Figura 28 reflejan que tratamientos de 48 horas provocaron un claro y significativo descenso de la expresión de ambos genes en todas las concentraciones ensayadas.

En los experimentos de toxicidad retardada ambos genes mostraron una sobreexpresión significativa tras 24 horas de recuperación después de la exposición a BBP, llegando en el caso del gen *EcR* a alcanzar valores de más del doble de los del control.

Al igual que ocurrió en los tratamientos agudos a 24 horas (Figura 25), estos genes volvieron a mostrar un comportamiento similar entre ellos. Estos resultados indican que en las nuevas condiciones ensayadas el BBP vuelve a tener un efecto claro sobre los genes relacionados con rutas hormonales.

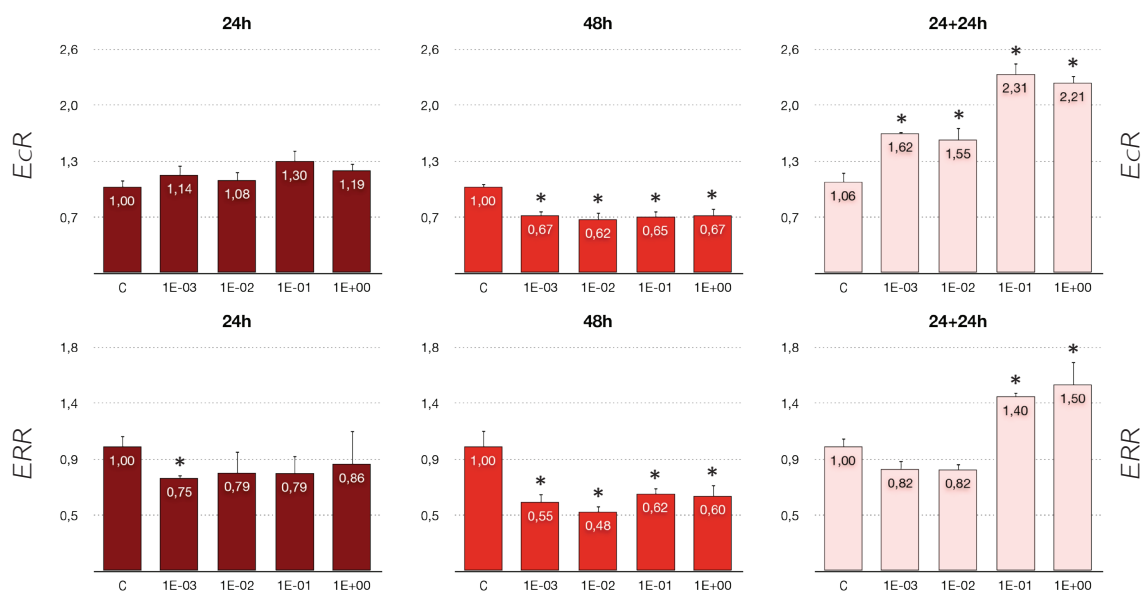


FIGURA 28. Análisis de la expresión de genes relacionados con la ruta hormonal de la ecdisona (*EcR*, *ERR*) en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Efectos sobre el metabolismo energético

Se evaluó el efecto del BBP sobre el metabolismo energético mediante el análisis de los niveles de expresión de GAPDH (Figura 29). Como control interno se utilizó un fragmento de 201 pb del gen de la actina. Como se puede ver en los resultados presentados en la Figura 30, el BBP no provocó cambios significativos en exposiciones de 24 horas. Sin embargo, tras 48 horas de tratamiento se produjo una ligera, aunque significativa, disminución en la expresión del gen que codifica para la enzima GAPDH, involucrada en la obtención de energía a través de la glucólisis.

Frente a este comportamiento, los estudios de toxicidad retardada mostraron una recuperación en los niveles de transcrito de *GAPDH*, con valores cercanos a los del control.

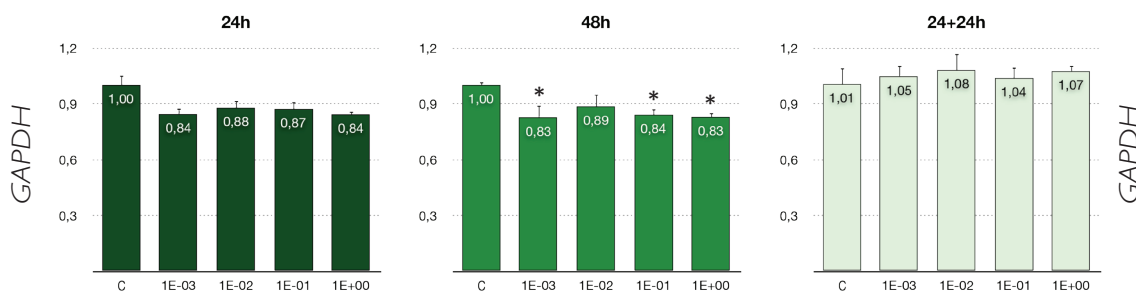


FIGURA 29. Análisis de la expresión de *GAPDH*, gen relacionado con el metabolismo energético, en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### Efectos sobre el metabolismo de detoxificación

Para analizar la capacidad del BBP de alterar distintos mecanismos relacionados con el metabolismo de detoxificación, se realizó el estudio de los niveles de expresión del gen *CYP450* y de la actividad enzimática de GST. En el caso de este compuesto, se añadió también al estudio el análisis de la expresión del gen *GPx*, codificante para la glutatión peroxidasa, una enzima que juega un papel crucial en la defensa de la célula frente al daño oxidativo.

Los resultados de la Figura 30 muestran una gran estabilidad de los genes *CYP450* y *GPx* en los tratamientos de 24 horas con BBP, seguida de una represión significativa a las 48 horas de tratamiento.

En los estudios de toxicidad retardada se observó un aumento significativo de los niveles de transcrito del gen *CYP450* en la concentración más alta analizada ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), mientras que el gen *GPx* mostró valores similares al control. Estos datos sugieren la reactivación de la respuesta detoxificadora vía Fase I tras la retirada del compuesto del medio de cultivo.

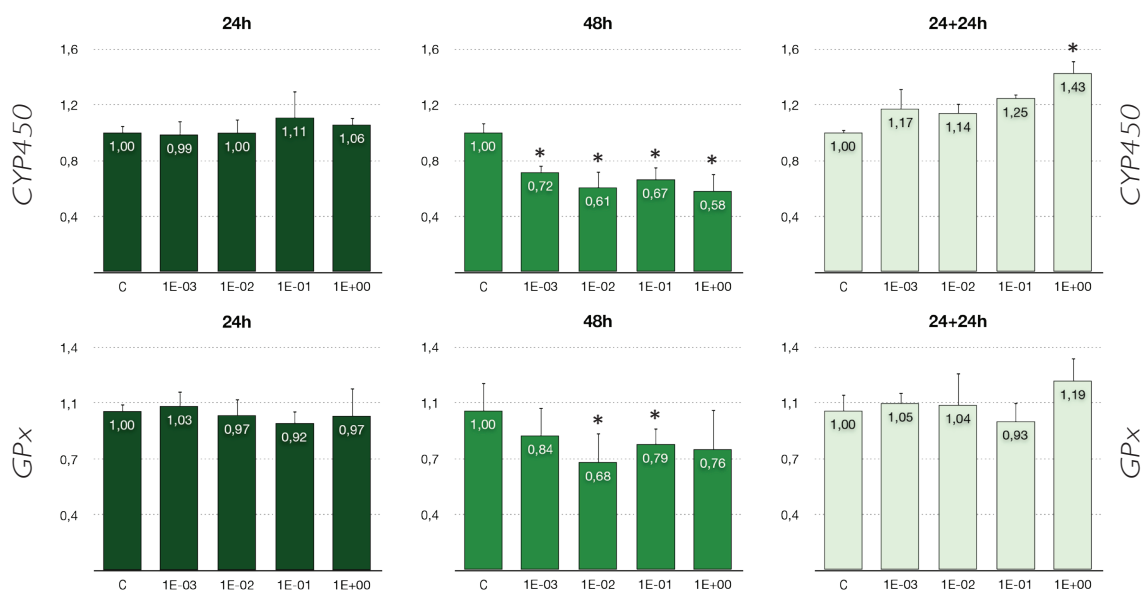


FIGURA 30. Análisis de la expresión de *CYP450* y *GPx*, genes relacionados con el metabolismo de detoxificación, en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que en el caso del DEHP, la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa en larvas expuestas a BBP se valoró para las concentraciones de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $1 \text{mg l}^{-1}$  (Figura 31), tanto en exposiciones agudas de 24 y 48 horas como en estudios de toxicidad retardada.

Los resultados obtenidos mostraron un descenso de esta actividad enzimática dependiente de tiempo y concentración. Este descenso, cercano al 30% a las 24 horas, sólo resultó significativo tras 48 horas de tratamiento con la dosis más alta estudiada ( $1 \text{mg l}^{-1}$ ), donde se alcanzaron valores un 70% por debajo de los obtenidos para larvas no tratadas.

Respecto a los estudios de toxicidad retardada, el descenso detectado tras las primeras 24 horas de exposición a BBP continuó durante las 24 horas siguientes a la retirada de la droga, siendo estadísticamente significativo en las dos concentraciones estudiadas, en ambos casos con valores cercanos al 40% por debajo de los del control.

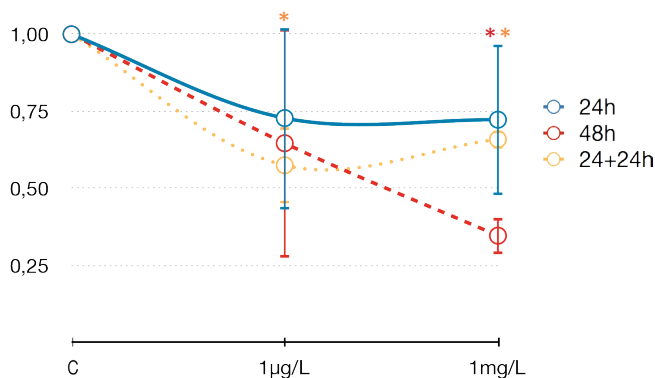


FIGURA 31. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en larvas de *C. riparius* expuestas a BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Ordenadas: actividad relativa ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### 2.2.2.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL BBP

- La exposición a BBP provoca una mortalidad significativa en las larvas acuáticas de *C. riparius* en concentraciones superiores a  $10^3 \mu\text{g l}^{-1}$ .
- El BBP afecta de forma significativa a la biogénesis de los ribosomas, mostrando un efecto temprano en la transcripción de los genes ribosómicos y provocando un descenso de los niveles de ARN prerribosómico en las dosis más altas. Provoca asimismo un descenso significativo en los niveles de expresión del gen *rpL4*. Exposiciones prolongadas a dosis bajas también alteran esta ruta, afectando en mayor medida a las proteínas ribosómicas al provocar la represión de *rpL4*, *rpL11* y *rpL13*.
- El BBP afecta a diversos genes relacionados con la respuesta de estrés. En tiempos cortos de exposición provoca una activación dependiente de dosis muy específica de los genes *hsp70* y *hsp27*, así como una represión significativa de *hsp40*. Frente a estas alteraciones destaca la notable estabilidad en todas las condiciones estudiadas del gen *hsc70*. Exposiciones prolongadas provocan una represión significativa de todos los genes de choque térmico estudiados, excepto *hsc70*. En los estudios de recuperación se inducen significativamente los genes *hsp70* y *hsp10*.
- El BBP produce un efecto temprano sobre genes que codifican para receptores de hormonas esteroideas, provocando un incremento significativo en la expresión del gen del receptor de ecdisona a las dosis más altas ensayadas. Además, el gen *ERR*, que codifica para un receptor relacionado con estrógenos, mostró una respuesta similar a la del *EcR*. Esto refleja la capacidad disruptora de este compuesto a tiempos cortos de exposición y contrasta con los efectos del DEHP en las mismas condiciones, que no produjeron alteraciones significativas. La exposición a tiempos largos y dosis bajas de BBP provoca un claro y significativo descenso de la expresión de ambos genes en todas las concentraciones. Es interesante señalar que tras la retirada del tóxico se produce una notable activación del gen *EcR* y también se reactiva el gen *ERR*, mostrando por tanto este fármaco un efecto retardado en la inducción de estos genes.
- Los resultados del estudio sobre metabolismo celular reflejan que el BBP no parece tener un efecto temprano sobre las dianas estudiadas en las dos rutas analizadas. Sin embargo, en exposiciones prolongadas provoca una disminución significativa de los niveles de expresión de GAPDH.
- Respecto a las rutas de detoxificación, los resultados muestran una tendencia similar en los dos sistemas estudiados, con descensos significativos de la actividad transcripcional del gen *CYP450* y de la actividad de la enzima GST.

### 2.2.3. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE LA GLÁNDULA SALIVAL

Una aproximación citológica para evaluar el daño citotóxico de exposiciones agudas a xenobióticos consiste en analizar los cambios producidos en los patrones de expresión del genoma en *C. riparius*. Los cromosomas politénicos, típicos de las glándulas salivales de insectos superiores, constituyen un material excepcional para visualizar alteraciones en la expresión génica, que se detecta con facilidad en este tipo de estructuras. Cuando se encuentran activos, muchos genes se manifiestan como un abultamiento o *puff* en estos cromosomas, relacionándose de manera general el tamaño del *puff* con una mayor descondensación de los cromosomas y, por consiguiente, con un mayor nivel de expresión o actividad del gen.

Tras comprobar que el BBP produjo una disminución significativa de los niveles de expresión de todos los genes de las rutas analizadas en el estudio a 48 horas en *C. riparius*, se intentó determinar si éste se trataba de un efecto mucho más general que afectaba de forma indiscriminada a la actividad génica de las larvas. Para ello, se analizaron los patrones de expresión en cromosomas politénicos de células de glándula salival de larvas expuestas durante 24 y 48 horas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP, la dosis más alta utilizada en los estudios a tiempos largos. Estos patrones no fueron analizados en los tratamientos equivalentes con DEHP ya que, en general, en las condiciones experimentales equivalentes no se apreciaron alteraciones significativas en la actividad de las distintas dianas seleccionadas.

La evaluación a nivel global del efecto del BBP sobre los patrones de expresión de los cromosomas se llevó a cabo mediante un anticuerpo que detecta híbridos de cadena ADN/ARN, reconociendo los sitios activos en términos de transcripción.

Las células control (Figura 32, a-f) presentaron múltiples señales de fluorescencia a lo largo de los cromosomas más largos y característicos de esta especie (I, II y III), correspondientes a multitud de *loci* transcripcionalmente activos. (Figura 32, d-f). No se observaron importantes alteraciones en el patrón de expresión génica de estos cromosomas tras 24 horas de tratamiento con  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP (Figura 32, j-l), manteniéndose en general el número de bandas marcadas y la intensidad de las mismas, similares al control.

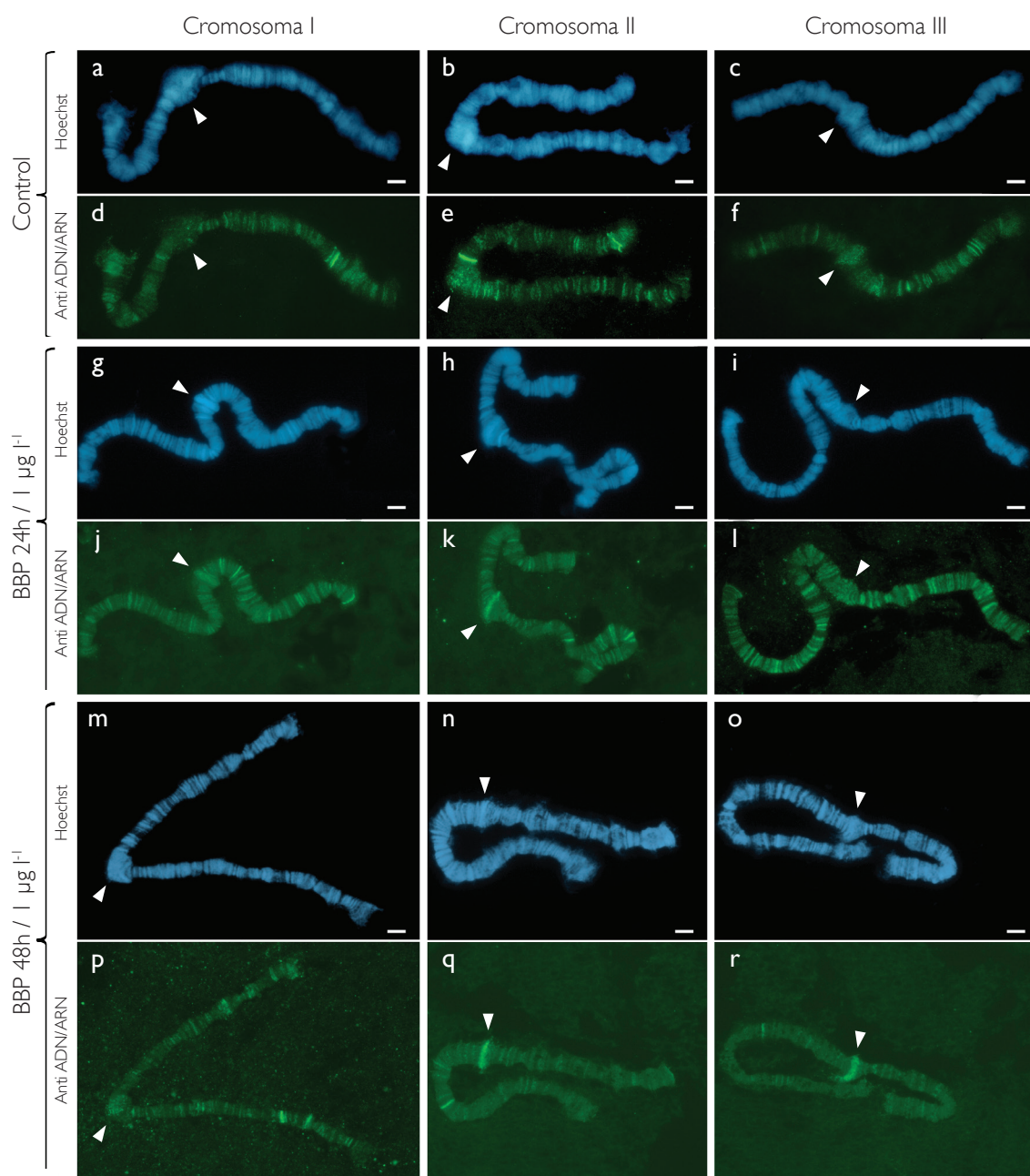


FIGURA 32. Imágenes representativas del patrón de expresión génica en cromosomas politénicos de larvas de *C. riparius* expuestas a 1 µg l<sup>-1</sup> BBP durante 24 y 48 horas. Células procedentes del tejido de la glándula salival. Las cabezas de flecha señalan las regiones centroméricas. Escala 10 µm.

Por el contrario, los resultados obtenidos tras 48 horas de exposición a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP mostraron un cambio drástico en el patrón general de expresión, observándose importantes alteraciones en estos cromosomas. Como se observa en la Figura 32 (p-r), se produjo una disminución generalizada de las señales fluorescentes que identifican *loci* transcripcionalmente activos. Este descenso en la señal fluorescente detectada a nivel citológico confirma el efecto observado sobre los niveles de expresión de los genes biomarcadores seleccionados para el estudio previo, si bien el análisis citológico refleja una alteración del patrón de expresión génica mucho más general y no limitada a los genes estudiados. Aun así, conviene resaltar que la alteración detectada en el patrón de expresión no se correspondió con la respuesta característica ante un choque térmico (*heat shock*), bien caracterizada en este organismo y que provoca una drástica inhibición generalizada a lo largo de grandes regiones de los cromosomas (Morcillo y col., 1993).

En contraposición a este descenso generalizado de actividad transcripcional, cabe destacar un claro incremento de la señal fluorescente en las regiones centroméricas de los cromosomas II y III, que se caracterizan por la presencia de heterocromatina. Aunque en condiciones control se pueden observar ocasionalmente señales intensas en algunas regiones centroméricas, la exposición a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP provocó un claro incremento tanto en la intensidad de la señal como en la frecuencia. Este resultado se repitió en todas las observaciones y en los mismos cromosomas (II y III).

Por último, cabe destacar la ausencia de señales en otras regiones ricas en heterocromatina, como son los telómeros, donde tras 24 y 48 horas de tratamiento no se apreciaron señales *de novo* ni alteraciones respecto a las mismas regiones en larvas no tratadas.

### 2.2.3.1. LOS ANILLOS DE BALBIANI Y EL NUCLEÓLO

Tras los resultados obtenidos en el análisis citológico de las regiones transcripcionalmente activas en los cromosomas politénicos de larvas expuestas a BBP, se decidió profundizar en el estudio detallado del cromosoma IV por la importancia funcional de regiones como los anillos de Balbiani (BRs) o el nucléolo.

Los genes *BR* se encuentran entre los *loci* más activos de las células salivales en ausencia de estrés, ya que producen unas proteínas gigantes que formarán parte de la secreción con la que las larvas construyen los tubos en los que viven. Estos genes son, por tanto, esenciales para la supervivencia de las larvas, por lo que constituyen un buen parámetro para evaluar el efecto tóxico de xenobióticos.



El estudio de la morfología y de la actividad transcripcional de los BRs se llevó a cabo utilizando el anticuerpo antihíbrido ADN/ARN. La tinción con Hoescht 33258 permitió visualizar las regiones correspondientes al nucléolo y a los genes *BR*, evaluando así la actividad transcripcional como reflejo del grado de descondensación de las mismas.

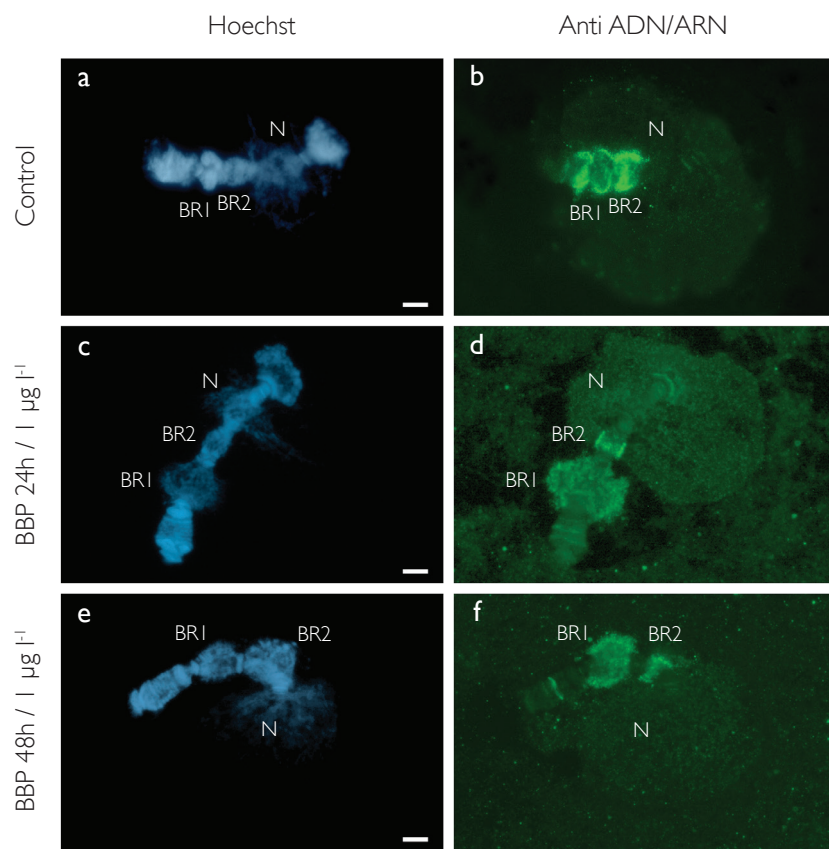


FIGURA 33. Detección in situ de secuencias híbridas de ADN/ARN en el cromosoma IV de larvas de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP durante 24 y 48 horas. Células procedentes del tejido de la glándula salival. Se señalan los BRs (BR1 y BR2) y el nucléolo (N). Las secuencias híbridas fueron detectadas con un anticuerpo conjugado con FITC. Escala  $10 \mu\text{m}$ .

En ausencia de tratamiento, BR1 y BR2 presentaron un alto grado de descondensación (Figura 33a) que se evidenció con una alta señal fluorescente del anticuerpo antihíbrido (Figura 33b). Tras una primera aproximación a nivel visual, la semicuantificación y el posterior análisis estadístico permitieron obtener un valor relativo de cada variable estudiada tras la exposición a BBP, en comparación con la situación en

las larvas no tratadas. Para cada uno de los tratamientos experimentales se realizó un recuento de la señal de los BRs en un total de 150 células de glándula salival procedentes de seis larvas diferentes, de acuerdo al modelo descrito por Beermann (1971). En dicho modelo, la estimación semicuantitativa de la actividad se basa en la definición de tres categorías en función de que el engrosamiento (*puff*) sea mayor, igual o menor que la anchura del cromosoma politénico en esa región: expandido, semiexpandido y retraído, respectivamente.

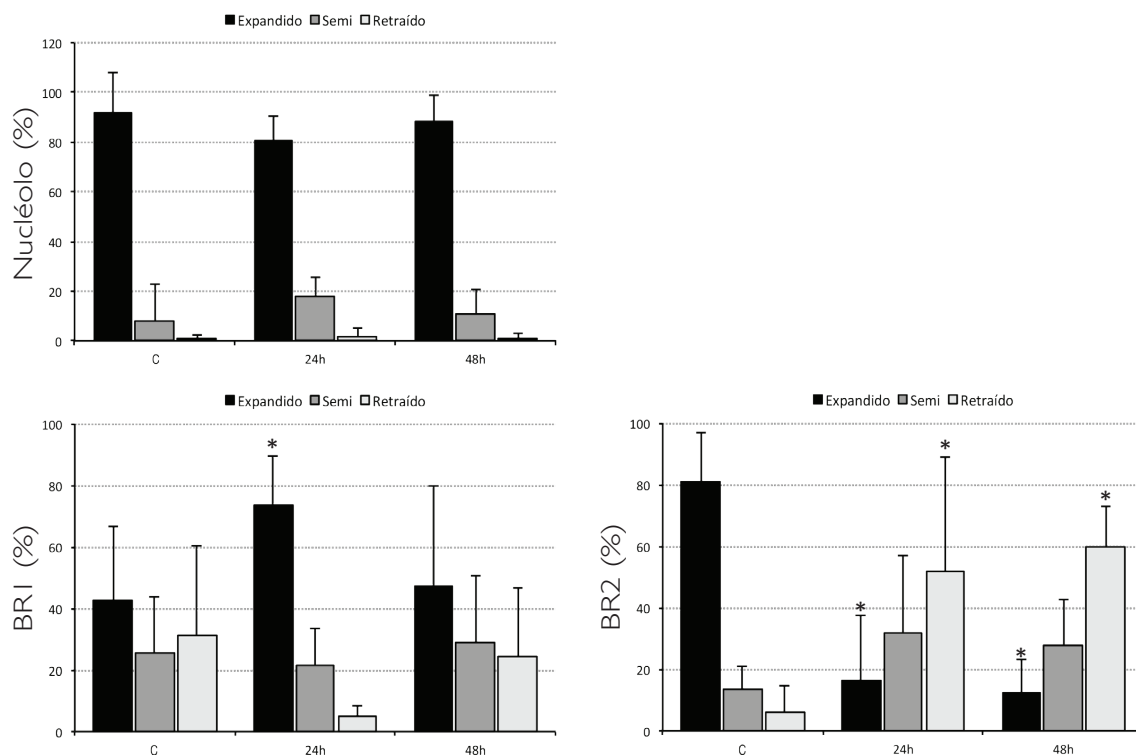


FIGURA 34. Efecto sobre el patrón de condensación del nucléolo y de los *puffs* BR1 y BR2 en larvas de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP durante 24 y 48 horas. Células procedentes del tejido de la glándula salival. Para cada tiempo de exposición, se muestran los resultados obtenidos de la observación de 150 cromosomas de seis larvas diferentes. La cuantificación de las distintas categorías en base al grado de condensación se llevó a cabo de acuerdo al método de Beermann (1971). Abscisas: tiempo. Ordenadas: porcentaje ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos mostraron que el BBP alteró de forma significativa el patrón de actividad de BR2, produciendo una retracción importante del *puff* ya desde las primeras 24h de exposición (Figura 33d), efecto que se mantuvo también en el tratamiento de

48 horas (Figura 33f). En estas condiciones, el porcentaje de BR2 expandidos no superó el 20%. Sin embargo, a pesar de la disminución del tamaño, no se produjo una inhibición total de su actividad, detectándose una elevada señal fluorescente incluso tras 48 horas de exposición a BBP.

Por el contrario, en el caso de BRI se observó una tendencia hacia la expansión que resultó significativa tras las primeras 24 de tratamiento (Figura 33d), seguida de una disminución del tamaño a las 48 horas (Figura 33f). Cabe destacar la elevada variabilidad que presentan los datos recogidos para BRI, quizás debida a que el gen *BRI* presenta diferencias en sus niveles de expresión en función de que las larvas de estadio IV empleadas en el estudio se encuentren en un grado de desarrollo más o menos avanzado.

El nucléolo es una región con alto grado de actividad transcripcional que en ausencia de tratamiento presenta las fibras de ADN ribosómico altamente expandidas. Con el fin de analizar a nivel citológico el efecto del BBP sobre el nucléolo, se utilizó el mismo anticuerpo anti-híbrido ADN/ARN y también se definieron tres categorías bien diferenciadas, en función del mayor o menor grado de expansión de las fibras de cromatina de la región desde su punto de origen en el cromosoma. Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico mostraron que dosis agudas de BBP no afectaron el tamaño del nucléolo en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 34). Estos datos confirman los obtenidos en el análisis de los niveles de expresión del espaciador intergénico *ITS2*, donde tampoco se detectaron alteraciones significativas en los niveles de ARNr no maduro tras la exposición a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  BBP.

### 2.2.3.2. RESUMEN DE LOS EFECTOS CITOLÓGICOS DEL BBP

- La exposición a BBP provoca una disminución generalizada en la señal de regiones activas de los cromosomas a tiempos largos de exposición. Sin embargo, va acompañada de un notable incremento en las regiones centroméricas.
- El análisis citológico en profundidad del cromosoma IV de *C. riparius* mostró que el BBP altera la morfología del BR2, con una reducción del tamaño del *puff* aunque sin llegar a provocar una inhibición total de su actividad transcripcional, mientras que aumenta de manera significativa la expresión de BRI durante las primeras 24 horas. Respecto a la morfología del nucléolo, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño y la expansión de las fibras.

### 3. ESTUDIOS EN POBLACIONES NATURALES

Para el estudio de los efectos tóxicos del DEHP y el BBP sobre larvas de poblaciones naturales de *Chironomus riparius* se seleccionó únicamente la concentración de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de cada uno de los compuestos, correspondiente a la concentración más alta del rango bajo de concentraciones analizado en los estudios de laboratorio.

Se abordó este análisis desde una perspectiva similar a la metodología seguida en los ensayos de laboratorio, comprobando en primera instancia la capacidad de estos compuestos para comprometer la supervivencia de los individuos expuestos y seleccionando para los estudios moleculares dianas génicas específicas de tres de las grandes rutas fisiológicas estudiadas. En este caso, por tratarse de una primera aproximación a este tipo de estudios de campo, se limitó el número de genes a estudiar en cada una de las rutas. Así, fueron seleccionadas las siguientes dianas: respuesta celular a estrés (*hsc70* y *hsp70*), ruta hormonal (*EcR* y *ERR*) y metabolismo (*CYP450* y *GST*).

Se llevaron a cabo tanto experimentos de toxicidad aguda, con 24 y 48 horas de exposición a los tóxicos, como pruebas de toxicidad retardada, en las que las larvas de poblaciones naturales fueron expuestas al tóxico durante 24 horas y mantenidas posteriormente 24 horas más en medio de cultivo fresco sin droga.

Todas las larvas empleadas en estos ensayos fueron recolectadas en el río Sar (Galicia), tal y como se especifica en el apartado 'Material y Métodos'.

#### 3.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

Se llevaron a cabo en primer lugar estudios para comprobar la supervivencia de larvas expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de ambos compuestos, contando en estos experimentos con dos controles distintos: 1) larvas mantenidas en medio fresco sin droga; y 2) larvas expuestas a la máxima concentración de solvente (EtOH) empleada para los tratamientos con cada compuesto (1%).

Los resultados de supervivencia se muestran en la Figura 35. Durante la comprobación rutinaria del efecto del solvente sobre este parámetro se pudo observar un aumento significativo de la mortalidad de los cultivos en los tratamientos de 48 horas debido a la acción del etanol, llevando la supervivencia a valores cercanos al 70%.

Con estos resultados se pudo comprobar que el DEHP, contrariamente a lo ocurrido en los cultivos de laboratorio, es el compuesto que produjo mayor mortalidad en las larvas de campo, rondando valores del 40% en los experimentos de 48 horas.

Los resultados del análisis de la toxicidad retardada mostraron un efecto negativo de ambos ftalatos incluso 24 horas después haber finalizado la exposición a los compuestos. Este efecto retardado en la viabilidad no se había observado en los cultivos de laboratorio.

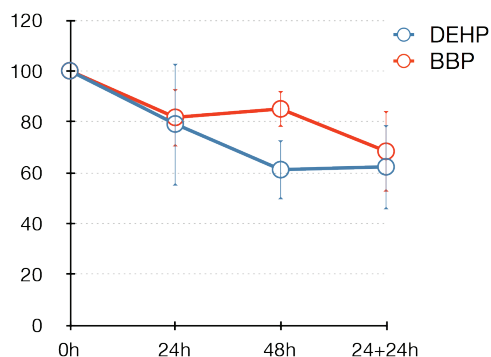


FIGURA 35. Análisis de la supervivencia de larvas de poblaciones naturales *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de DEHP y BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: porcentaje de supervivencia ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

## 3.2. ANÁLISIS DE LAS DIANAS CELULARES

### 3.2.1. DEHP

Los efectos provocados por el DEHP en las dianas celulares analizadas consistieron por lo general en una disminución de los niveles de expresión génica, como se puede apreciar en la Figura 36. En este sentido, se detectó una represión significativa a las 48 horas de exposición de los genes de choque térmico (*hsc70* y *hsp70*), que resultó mucho más acentuada y casi completa en el caso del *EcR* y *CYP450*. Tanto en estos dos últimos genes como en el *ERR* la represión resultó significativa ya desde las 24 horas de tratamiento.

Al igual que ocurrió con el análisis de supervivencia, los resultados obtenidos tras la exposición de las larvas de poblaciones naturales a DEHP reflejaron un mayor efecto tóxico de este compuesto en comparación con los datos obtenidos en los ensayos de laboratorio. En ambos casos se produjo una respuesta similar en cuanto a la tendencia a la represión de la expresión de los genes analizados, siendo estas alteraciones más tempranas y acentuadas en el caso de las larvas de poblaciones naturales. Así, en estas larvas las alteraciones resultaron estadísticamente significativas a partir de las 24 horas de tratamiento, mientras que en el laboratorio los efectos se observaban a partir de las 48 horas, o de forma significativa incluso en exposiciones más prolongadas (72 y 96h en el caso de *hsp70*). Cabe destacar en este punto la disminución de los niveles de transcrito observados en el gen *hsc70*, que se mostró muy estable en todos los ensayos llevados a cabo con larvas de laboratorio y que, sin embargo, pareció verse afectado por el DEHP en larvas de campo a la dosis y tiempos estudiados.

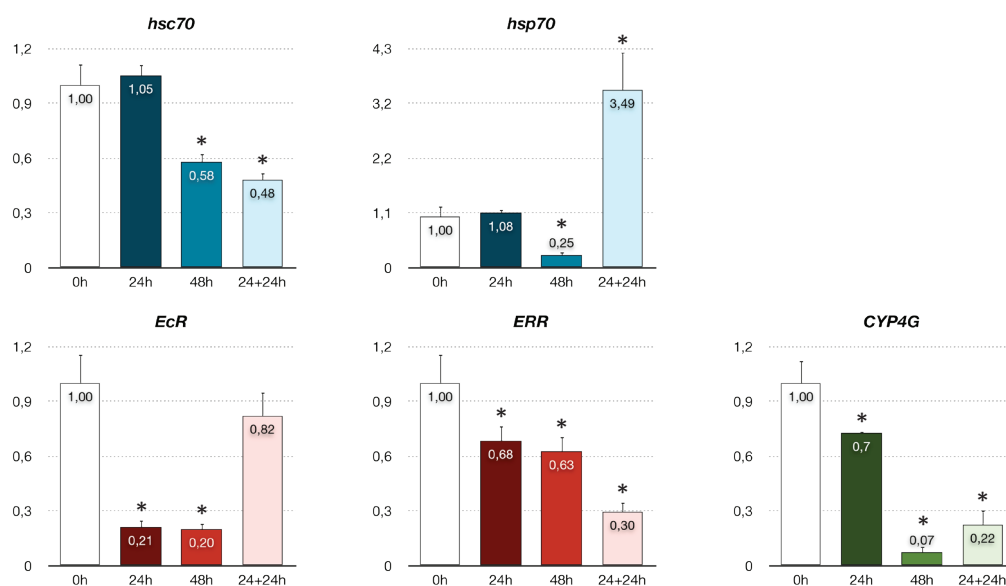


FIGURA 36. Análisis de la expresión génica en larvas de poblaciones naturales de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En los experimentos de toxicidad retardada, cuando se retira el tóxico del medio, destacan la fuerte recuperación del gen *hsp70*, con valores tres veces y media por encima de los del control, y la recuperación de la actividad del EcR, aunque sin llegar a alcanzar los valores de las larvas no tratadas. Por el contrario, los genes *ERR* y *CYP450* no fueron capaces de reactivarse tras la represión producida a las 24 horas de tratamiento y permanecieron fuertemente reprimidos, incluso con valores más bajos que a las 24 horas.

Respecto a los efectos sobre la ruta de detoxificación y en consonancia con el resto de genes analizados en este estudio, el DEHP provocó en larvas de poblaciones naturales una disminución significativa de los niveles de transcrito de *CYP450* a las 24 horas, con una media del 30% por debajo de los valores obtenidos en larvas no tratadas. Los tratamientos de 48 horas tuvieron un efecto drástico, produciéndose prácticamente la inhibición total de la actividad de este gen. Además, *CYP450* no fue capaz de reactivarse tras la represión producida en las primeras 24 horas de tratamiento, permaneciendo fuertemente inhibido en ausencia del tóxico. Estos resultados permitieron apreciar tendencias similares en el efecto del DEHP sobre *CYP450* tanto en larvas de laboratorio como en larvas de campo, midiéndose de nuevo un mayor efecto tóxico en las segundas. A tenor de los resultados obtenidos, éstas verían muy mermada su capacidad de detoxificación de Fase I a través de la proteína *CYP450*.

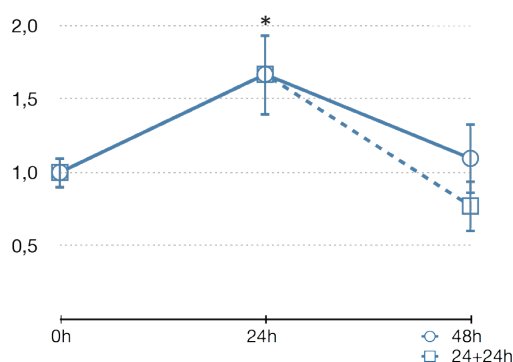


FIGURA 37. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en poblaciones naturales de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de DEHP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: actividad relativa ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Sí se apreció una respuesta diferente entre las dos poblaciones al analizar la actividad enzimática de GST (Figura 37). En la dosis de DEHP estudiada en campo ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) las larvas de laboratorio mostraron una disminución de esta actividad dependiente de tiempo: de un 20% por debajo del valor del control a las 24 horas de tratamiento y de un 50% a las 48 horas, manteniéndose al 50% en los experimentos de toxicidad retardada. En el caso de larvas de campo, en contraposición, los resultados reflejaron un aumento significativo de la actividad de GST tras 24 horas de exposición al compuesto, volviéndose a alcanzar valores próximos a los del control tanto en los tratamientos agudos de 48 horas como en los experimentos de toxicidad retardada. Contrariamente a lo que ocurre con *CYP450* y la Fase I de detoxificación, estos resultados parecen indicar una inducción de los procesos de biotransformación característicos de la Fase II, desencadenándose así una posible respuesta adaptativa por parte de las larvas frente al efecto tóxico de este xenobiótico.

### 3.2.2. BBP

En el caso de las exposiciones a BBP de larvas de poblaciones naturales, la respuesta de los distintos genes estudiados fue notablemente distinta a la observada tanto con el otro ftalato como con el propio BBP en larvas de laboratorio (Figura 38).

En primer lugar, los resultados reflejaron una clara inducción de los dos genes de estrés estudiados, con un fuerte incremento en los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico HSP70 y HSC70, alcanzando valores 15 veces por encima de los del control en el caso de *hsp70*. Habiéndose descrito la ausencia de alteraciones tras la exposición a una gran variedad de tóxicos, como se ha comentado con anterioridad, destaca también la activación dependiente de tiempo que provoca el BBP sobre *hsc70*.

Las diferencias detectadas en la expresión de los genes *hsc70* y *hsp70* contrastan con los efectos que este compuesto provocó en las mismas condiciones experimentales sobre larvas de laboratorio, caracterizados por la estabilidad de los niveles de expresión del primero y la represión del segundo tras 48 horas de tratamiento. Los elevados niveles de expresión de ambos genes en poblaciones naturales expuestas podría indicar un papel protector relevante de los mismos ante los posibles efectos tóxicos, así como una rápida respuesta adaptativa de las poblaciones naturales de *C. riparius* para la supervivencia en ambientes contaminados.

Respecto a la ruta hormonal de los insectos, el efecto del BBP fue muy similar en los dos genes seleccionados (*EcR* y *ERR*), produciendo una notable represión



tras 24 horas de exposición al compuesto seguida de una fuerte sobreexpresión en las 24 horas siguientes tanto en presencia del compuesto como en estudios de toxicidad retardada, alcanzando valores de hasta 5 veces los obtenidos en larvas no tratadas. Estos resultados contrastan de nuevo con los obtenidos en las mismas condiciones en larvas de laboratorio, donde el BBP indujo una represión dependiente de tiempo en la actividad de estos genes, significativa tras 48 horas de tratamiento. A pesar de observarse en estos genes un efecto diferente en tiempo e intensidad, destaca el hecho de que tanto el *EcR* como el *ERR* presentan un comportamiento similar por la exposición a este compuesto en las distintas poblaciones estudiadas (laboratorio y campo).

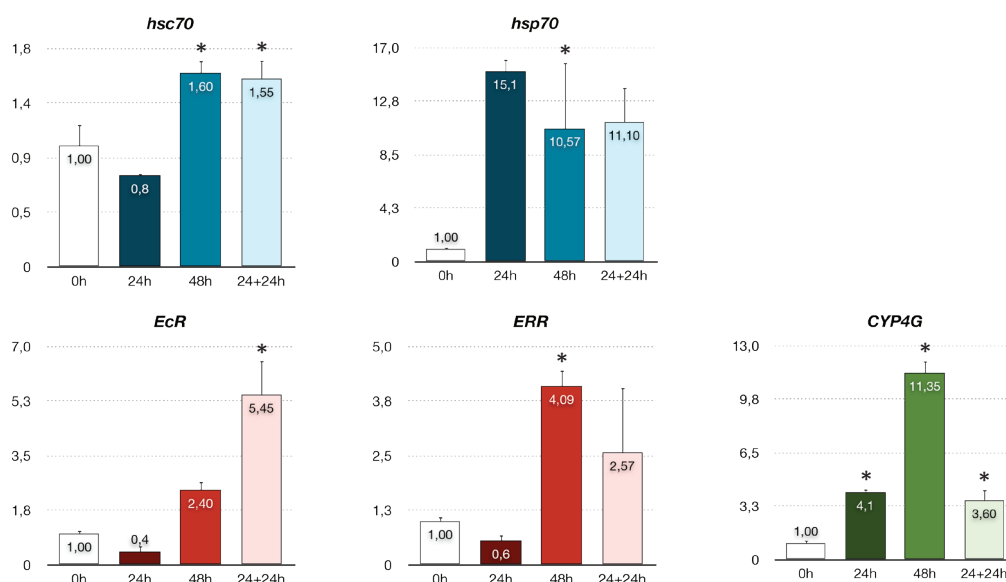


FIGURA 38. Análisis de la expresión génica en larvas de poblaciones naturales de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En lo referente a la ruta de detoxificación, la presencia de BBP en el medio activó notablemente la actividad detoxificadora de las larvas mediante la sobreexpresión del gen *CYP450* en todas las condiciones experimentales analizadas. También en este caso la respuesta de este marcador varió con respecto a lo observado en las poblaciones de laboratorio, con un descenso en los niveles de expresión en larvas de cultivo con tratamientos de 48 horas y una fuerte sobreexpresión en las mismas condiciones en larvas de

poblaciones naturales. Por tanto, estos resultados parecen indicar una mayor capacidad de las larvas de campo para activar la ruta de detoxificación vía CYP450 (Fase I) tras la exposición a BBP.

Los ensayos de toxicidad retardada mostraron cómo la retirada del compuesto del medio de cultivo provocó una fuerte inducción de la actividad de todos los genes analizados. Este hecho contrasta con la incapacidad de las larvas de reactivar estos mismos genes en los tratamientos con DEHP, en los que sólo se activó *hsp70* y lo hizo con una intensidad tres veces menor que en el caso del BBP. Aunque esta activación génica se produjo también en larvas de laboratorio, lo hizo en mayor grado en las de campo, lo que sugiere que en las larvas de poblaciones naturales se desencadenan más rápidamente los mecanismos de transcripción normales tras la retirada de la droga, incluso en los casos en los que las dianas estudiadas se reprimen tras las primeras 24 horas de tratamiento (como es el caso de los genes de la ruta hormonal, *EcR* y *ERR*).

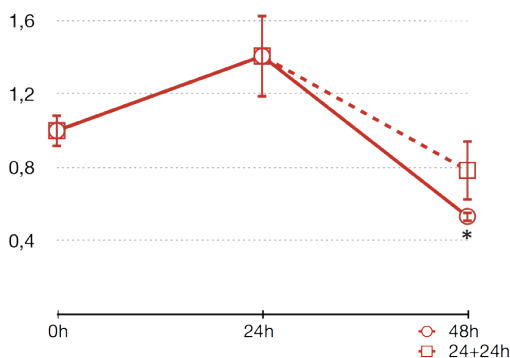


FIGURA 39. Análisis de la actividad de la glutatión S-transferasa en poblaciones naturales de *C. riparius* expuestas a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  de BBP durante 24 y 48 horas, así como en larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: actividad relativa ( $M \pm SE$ ). \* Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Dentro de la ruta de detoxificación, los resultados obtenidos para actividad enzimática de GST en larvas de campo tratadas con BBP reflejaron un leve aumento de la actividad a las 24 horas de tratamiento y un descenso por debajo de los valores del control en los experimentos a 48 horas y de toxicidad retardada, significativo en el caso de los primeros (Figura 39). Es interesante resaltar que la actividad GST mostró en las primeras 24 horas una respuesta opuesta a la observada con este mismo compuesto

en larvas de laboratorio, en las que la actividad se vio reprimida, lo que a su vez refleja la distinta capacidad de las larvas de una y otra población de activar las reacciones de detoxificación de Fase II.

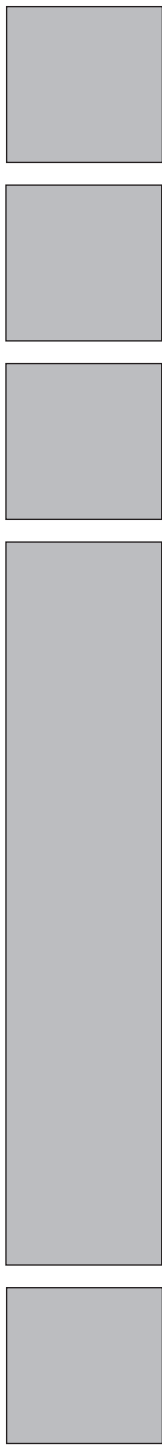
Por último, cabe destacar que los dos ftalatos estudiados produjeron de manera similar un aumento en la actividad GST durante las primeras 24 horas de exposición. La retirada de la droga tras este tiempo permitió observar también una tendencia parecida, con una ligera inhibición, en los estudios de toxicidad retardada. Por el contrario, a las 48 horas de tratamiento esta igualdad se vio alterada y el BBP demostró ejercer un mayor efecto inhibitorio que el DEHP sobre esta actividad enzimática.

### 3.3. RESUMEN DE LOS EFECTOS EN POBLACIONES NATURALES

Los resultados obtenidos sobre larvas de campo muestran algunas diferencias en cuanto a la toxicidad y los efectos de ambos ftalatos con respecto a los obtenidos en las mismas condiciones en las poblaciones de laboratorio.

- En el caso del DEHP, el estudio ha permitido detectar un mayor grado de toxicidad en larvas de campo de *C. riparius*. En general, el efecto del DEHP sobre los genes diana analizados es similar; en términos cualitativos, al descrito previamente en poblaciones de laboratorio. Sin embargo, hay que destacar una inhibición más rápida y drástica de los genes hormonales, así como un efecto inhibitorio sobre el gen *hsc70*, que en las poblaciones de laboratorio permanece muy estable e inalterable.
- En el caso del BBP, el efecto sobre algunas de las dianas analizadas difiere entre las dos poblaciones estudiadas. Es notable la activación, rápida y elevada, del gen *hsp70*, así como del gen *CYP450* de la ruta de detoxificación. La activación de los genes hormonales es también mayor y más rápida que la que se observa en poblaciones de laboratorio. Como el DEHP, altera el gen *hsc70*, en este caso activándolo, efecto que en las poblaciones de laboratorio no se había observado.
- Los estudios con larvas de campo con ambos ftalatos han permitido detectar el claro efecto que son capaces de producir sobre la actividad enzimática de detoxificación mediante la enzima GST que, en contraposición a lo observado bajo las mismas condiciones de ensayo en larvas de laboratorio, en el caso de las poblaciones naturales se activa rápidamente.





# DISCUSIÓN



El trabajo de investigación llevado a cabo en esta tesis se ha encaminado hacia la evaluación ecotoxicológica de dos ftalatos, di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butil bencil ftalato (BBP), con una amplia variedad de usos industriales, ubicua presencia como contaminantes y señalados como prioritarios por la Unión Europea en cuanto a su evaluación del riesgo medioambiental y sobre la salud. Para ello, se han analizado dianas celulares en *Chironomus riparius*, un macroinvertebrado béntónico ampliamente utilizado en estudios de toxicidad acuática, con el objetivo de encontrar marcadores de toxicidad que puedan ser de utilidad en las evaluaciones de riesgo ecotoxicológico.

En los últimos años, multitud de trabajos científicos han puesto de manifiesto la utilidad del empleo de herramientas celulares y moleculares dentro del campo de la Ecotoxicología, las cuales podrían permitir detectar los efectos tempranos de compuestos tóxicos sobre ecosistemas naturales. Los estudios de expresión génica han adquirido cada vez mayor relevancia en la evaluación de los efectos de contaminantes, dado que pueden resultar más sensibles y requerir menos tiempo de análisis que las dianas toxicológicas convencionales. Además, ofrecen información sobre los modos de acción y proporcionan una mayor entendimiento de los efectos tóxicos (Ankley y col., 2009; Steinberg y col., 2008). No obstante, el escaso conocimiento del genoma de *Chironomus*, en comparación con el de otros insectos como *Drosophila* o *Anopheles*, hace que los estudios de toxicogenómica, que serían de gran relevancia por el interés ecotoxicológico de sus especies, resulten aún hoy difícilmente abordables.

En este sentido, una primera aportación metodológica de este trabajo ha sido la caracterización de una serie de genes en *Chironomus riparius*, de los que hasta el momento se carecía de información. Se han identificado a nivel de secuencia fragmentos correspondientes a los genes *hsp10* y *rpl4*, que codifican respectivamente para la proteína de choque térmico HSP10 y la proteína ribosómica RPL4, habiendo aumentado gracias a ello la lista de potenciales biomarcadores utilizados en nuestro laboratorio para la evaluación toxicológica de compuestos.

Sobre la base de que cualquier cambio que pueda producirse en un organismo por la acción de un tóxico suele depender en última instancia de cambios en el patrón de expresión de sus genes, modulados de una u otra manera según las características de cada compuesto, se han analizado potenciales dianas génicas seleccionadas por su relación con distintas rutas metabólicas y hormonales de interés. Se trata de una primera aproximación a las posibles dianas específicas y/o comunes de estos dos ftalatos, con el fin de aportar elementos que permitan establecer sus mecanismos de acción sobre las células. Si bien ambos ftalatos han sido ampliamente descritos en la bibliografía, los estudios en invertebrados son muy escasos. En el caso del DEHP existen algunos trabajos

previos sobre potenciales dianas moleculares, sin embargo, conviene destacar la escasa información existente sobre el efecto del BBP en invertebrados, así como la novedad que supone el abordaje comparativo de ambos compuestos realizado en esta tesis, que ha permitido identificar tanto efectos comunes como notables diferencias entre ellos.

Los estudios iniciales sobre la mortalidad producida en las larvas de *C. riparius* por la exposición a distintas concentraciones de estos compuestos arrojaron las primeras diferencias en la capacidad tóxica de los mismos. En el caso del DEHP, ninguna de las concentraciones analizadas en ninguno de los tiempos afectó significativamente a la supervivencia de las larvas, aunque sí se detectó un descenso generalizado de la movilidad y una pérdida de la coloración de las larvas de manera proporcional al aumento de la concentración. El BBP, por el contrario, mostró una elevada toxicidad sobre las larvas expuestas a las concentraciones más altas, con una mortalidad cercana al 60%, no alterándose ni la movilidad ni el color de las supervivientes.

La movilidad de las larvas, aunque no fue una diana analizada en este trabajo, se considera un parámetro equivalente a la letalidad en algunos ensayos ecotoxicológicos (Maul y col., 2008; OECD, 2011). Igualmente, la cuantificación de la decoloración de las larvas podría emplearse como un indicador temprano de la toxicidad de un compuesto (Halpern y col., 2002; Majumdar y Gupta, 2012). La pérdida de la pigmentación roja, típicamente asociada con la hemoglobina, es una característica representativa de larvas sometidas a condiciones de estrés por hipoxia (MacDonald y col., 2004).

Se han estudiado los efectos tóxicos en exposiciones cortas (24h), prolongadas (hasta 96h) y retardadas (24h de tratamiento y 24h de recuperación sin el tóxico). Si bien en un primer momento se realizó una aproximación al efecto de cada uno de los ftalatos en un rango muy amplio de concentraciones (hasta  $10^5 \mu\text{g l}^{-1}$ ), llegando a dosis muy elevadas, en base a los resultados obtenidos sobre la supervivencia los estudios posteriores con ambos compuestos se centraron en el rango de concentraciones más bajo (hasta  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ). A estas dosis en ningún caso se detectó mortalidad, evitando así en la medida de lo posible que las distintas alteraciones celulares y moleculares asociadas a un estado del organismo previo a la muerte pudieran enmascarar los efectos concretos de estos ftalatos sobre las dianas de estudio.

#### *Función nucleolar*

La primera aproximación a los efectos celulares de los ftalatos estudiados se llevó a cabo mediante el análisis de los niveles de ARNr y de la expresión de genes codificantes para distintas proteínas ribosómicas. Los genes implicados en la producción de ribosomas



son considerados genes *housekeeping*, fundamentales para la homeostasis celular y que se expresan de manera constitutiva e inalterable incluso bajo condiciones de estrés (Martínez-Guitarte y col., 2007; Planelló y col., 2007). Sin embargo, algunos estudios recientes han sugerido que su expresión puede verse alterada en respuesta a distintos efectos tóxicos (Achard-Joris y col., 2006; Nair y Choi, 2011a; Aliza y col., 2012).

Uno de los resultados más interesantes es el efecto diferencial de estos ftalatos en la función nucleolar, que sufre una perturbación significativa tras la exposición a BBP pero no parece ser alterada en exposiciones equivalentes a DEHP. Esta información se obtuvo, en primer lugar, a través del estudio de los niveles de expresión del espaciador intergénico *ITS2*, que se encuentra en secuencias no maduras de ARNr y permite localizar el efecto en el ARNr de nueva síntesis.

Hay que destacar que esta capacidad de inhibición de la transcripción de los genes ribosómicos parece ser específica del BBP, ya que el estudio realizado de forma paralela con DEHP no mostró ninguna alteración en los niveles de expresión del *ITS2*. Estos resultados parecen señalar al nucléolo como una diana celular de efecto temprano del BBP, que contrasta con el hecho de que el DEHP no afecta a la transcripción del ADN ribosómico.

En la actualidad, sólo algunos estudios señalan al nucléolo como una diana de efecto de algunos compuestos tóxicos. A nivel estructural se han descrito cambios significativos provocados por cadmio en células vegetales (Marcano et al., 2002; Liu y Kottke, 2004). En concreto, en *C. riparius* se ha descrito una reducción significativa de los precursores de ARNr de tamaño 32S y 45S, también provocada por este metal (Planelló y col., 2007), aunque, a diferencia del cadmio, no hay efecto sobre la transcripción ribosomal en el caso de exposición a bisfenol A (Planelló y col., 2008). Por tanto, los genes ribosomales parecen ser una diana celular específica de determinados tóxicos.

En base a estos datos, se planteó que el BBP pudieran afectar también a la síntesis de proteínas ribosómicas como parte de un efecto más general sobre la biogénesis ribosómica. El estudio de los niveles de expresión de diversas proteínas ribosómicas tras la exposición a los dos ftalatos mostró de nuevo un mayor efecto tóxico del BBP. Esta mayor toxicidad del BBP se refleja en una disminución de los niveles de expresión en el caso del gen *rpl4* desde las 24 horas de tratamiento y acentuada tras 48 horas, cuando se redujeron significativamente los niveles de todos los genes codificantes para las proteínas ribosómicas analizados. En comparación con estos resultados, el DEHP no provoca un efecto equivalente, ya que *rpl4* no resulta afectado y, en contraposición, provoca una activación retardada del gen *rpl13*.

Dado que el nucléolo resulta esencial para el proceso de síntesis de ribosomas y, por extensión, para la supervivencia de las células, es posible que el efecto que el BBP provoca sobre la síntesis de ARNr pudiera afectar a la síntesis de ribosomas a largo plazo. En este sentido el efecto del BBP sobre el proceso de biogénesis ribosómica podría ser mucho más general y producirse en otros organismos, aunque por el momento no hay información disponible al respecto.

La capacidad del BBP de alterar la funcionalidad del nucléolo y el mayor efecto inhibitorio en la actividad de los genes ribosomales por parte del BBP podría relacionarse con el hecho de que este compuesto desencadena una mayor mortalidad de las larvas. Dado que los procesos de transcripción ribosomal son esenciales para la producción de ribosomas, y puesto que éstos lo son para la síntesis de todas las proteínas celulares, la reducción proteica detectada en este trabajo conduce al fallo celular. La biogénesis de los ribosomas es la principal tarea celular y resulta un buen indicador para diagnosticar el metabolismo general de la célula, siendo los genes que codifican para proteínas ribosomales esenciales para el desarrollo de la misma (Chen e Ioannou, 1999). De hecho, casi cualquier alteración que provoque una ralentización del crecimiento celular o la síntesis de proteínas, como la falta de nutrientes o factores de crecimiento, la senescencia, un efecto tóxico, una infección viral, etc., se correlaciona con un descenso en la transcripción de ADNr (Grummt, 2010).

Hay que destacar por otro lado que, si bien la producción de ribosomas está relacionada directamente con la función del nucléolo, éste contiene algunas moléculas cuya presencia sugiere alguna función adicional, como la transcriptasa reversa que se asocia a los telómeros en *Chironomus* (Díez y col., 2006). Además, algunos estudios han sugerido que el nucléolo es un orgánulo sensible al estrés celular (Boisvert y col., 2007; Olson, 2004), hecho que resulta especialmente evidente bajo condiciones de estrés oxidativo, donde la transcripción de los genes ribosómicos disminuye de manera más rápida y drástica que el nivel de síntesis de ARNm de las células (Mayer y Bukau, 2005).

#### *Regiones centroméricas*

Tras la represión detectada en los niveles de actividad transcripcional por la acción tóxica del BBP, se abordó una aproximación citológica al efecto de este compuesto sobre la expresión génica general. El patrón general de expresión génica de los cromosomas politénicos, analizado mediante la detección de secuencias híbridas de ADN/ARN, permite una buena aproximación general al efecto tóxico de un compuesto. El marcaje de los cromosomas politénicos con un anticuerpo anti-híbrido ADN/ARN

reveló una disminución drástica de los niveles de señal observados tras 48 horas de exposición al compuesto, con un descenso generalizado de las señales transcripcionales intracromosómicas que, por el contrario, se apreciaban claramente en los cromosomas largos de las larvas control. Sin embargo, sorprendentemente, va acompañado de un notable aumento de señal en las regiones centroméricas, especialmente interesante debido a que se trata de zonas heterocromáticas que contienen ADN repetitivo y generalmente conocido por ser no codificante. Este resultado refleja la capacidad del BBP de inducir la descondensación de estas regiones específicas. Este tipo de respuesta se ha descrito previamente ante determinadas situaciones de estrés en *Chironomus*, como por ejemplo tras la exposición a dosis agudas de cadmio y bisfenol A (Planelló y col., 2007; Martínez-Guitarte y col., 2012), a aluminio (Michailova, 2003) y a cobre (Michailova, 2006). A pesar de que cada vez son más las referencias sobre la capacidad de determinados compuestos de influir sobre estas regiones heterocromáticas, se desconoce el significado fisiológico de esta respuesta.

#### *Anillos de Balbiani*

A nivel citológico, se prestó especial atención al cromosoma IV por la importancia funcional de regiones como los anillos de Balbiani (BRs). Los genes *BR* se encuentran entre los *loci* más activos de las células salivales y codifican para unas proteínas del tipo de la seda que las larvas de quironómidos secretan para fabricar los tubos donde se refugian y alimentan durante su estado larvario (Rydlander y Edström, 1980). Entre las funciones de estas proteínas se encuentran también las relacionadas con la respiración y la protección contra la depredación. Además, se ha descrito la función protectora de estos tubos frente a metales como el cobre (Halpern y col., 2002) y se ha sugerido que sirven como barrera contra la entrada en el organismo de sustancias tóxicas disueltas en el agua. De acuerdo con esta hipótesis, el aumento o el mantenimiento de los niveles de actividad de los genes *BR* podría interpretarse como una respuesta defensiva y protectora frente a la exposición a tóxicos. En este sentido, el fuerte aumento de la expresión detectado en BR1 tras 24 horas de exposición a BBP apoya esta posibilidad y podría asociarse con una respuesta defensiva ante los efectos tóxicos del ftalato. Este efecto contrastó con la disminución drástica del grado de condensación de BR2 tras las primeras 24 horas de tratamiento (más de un 70% de los casos observados), efecto que se mantuvo también a las 48 horas.

Existen pocos datos previos sobre la actividad de los BRs en respuesta a tóxicos. Dentro de la familia de los metales pesados destacan los estudios con cadmio, que no parece afectar a ninguno de los BRs (Planelló et al., 2007), y los estudios con cobre (Aziz et al., 1991), que muestran la supresión de la actividad del BR1 pero no la del

BR2. También se han descrito efectos a largo plazo en el tamaño de los BRs en estudios realizados en *Chironomus* procedentes de puestas expuestas a cobre (Michailova., 2003).

La represión significativa detectada en la expresión de BR2 podría estar relacionada con la capacidad del BBP de alterar el patrón de expresión ribosomal, lo que probablemente conlleve una afectación del ensamblaje y el transporte nucleocitoplásmico de múltiples productos de la transcripción (Baurén y Wieslander, 1994; Daneholt, 2001; Kiesler y col., 2002), pudiendo alterar en definitiva los procesos de traducción y la homeostasis celular.

Contrariamente a las alteraciones detectadas en los anillos de Balbiani, no se apreciaron cambios significativos en el nucléolo a nivel morfológico. Este dato refleja que a la concentración de BBP utilizada en este ensayo ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) no se producen alteraciones estructurales en el nucléolo y confirma el resultado obtenido a la misma dosis de BBP en el análisis del ARNr de nueva síntesis, donde tampoco se producen alteraciones funcionales en esta región.

#### Genes de estrés

Hasta la fecha, el estudio de los efectos de estos ftalatos sobre la expresión génica en *Chironomus* o bien es inexistente, como es el caso del BBP, o bien ha sido investigado a nivel de ARNm mediante RT-PCR (Park y Kwak, 2008a,b, 2009a,b). Nuestra investigación en esta línea se ha centrado en el estudio de determinados genes por su importancia en relación con importantes procesos fisiológicos celulares, entre los cuales están la respuesta a estrés, bien descrita en *Chironomus* (Morcillo y col., 1994; Martínez y col., 2001a,b).

Aunque en estudios ecotoxicológicos resulta atractiva la probada sensibilidad del gen *hsp70* en la respuesta celular de estrés, el examen de una única HSP puede no ser un bioindicador lo suficientemente representativo. En base a esta consideración, en el presente trabajo se llevó a cabo de manera simultánea el estudio de los niveles de expresión de varios genes que codifican para distintas proteínas de choque térmico, como son HSP70, HSC70, HSP40, HSP27 y HSP10, con el objeto de evaluar los posibles cambios provocados por los dos ftalatos y su potencial papel como biomarcadores moleculares de toxicidad acuática.

Las proteínas de choque térmico (HSPs) se encuentran entre las proteínas más primitivas y conservadas evolutivamente. Han aparecido homólogos de HSPs en todas las especies en las que se han llevado a cabo búsquedas de estos genes, así como en todos los reinos de los seres vivos, incluyendo los genomas más sencillos de las bacterias. Se han encontrado asimismo en todos los tipos celulares, tanto en situaciones normales como bajo condiciones de estrés, dado que juegan un papel crucial en muchos procesos

celulares fundamentales (Feder y Hoffman, 1999). La familia de genes de choque térmico codifica para proteínas que pueden ser responsables de la supervivencia y adaptación de las células bajo condiciones de choque térmico, así como durante la exposición a xenobióticos (Gupta y col., 2010).

De entre todas las HSPs, la familia de 70 kDa representa hasta la fecha una de las proteínas más conservadas, contando con miembros tanto constitutivos como inducibles en todos los organismos analizados (Mayer y Bukau, 2005). HSP70 es una de las proteínas más abundantes de entre aquellas inducibles bajo diferentes condiciones de estrés, mientras los genes codificantes para HSC70 se expresan también de manera constitutiva en las células. En los últimos años se ha producido un avance significativo en el conocimiento de las funciones celulares de esta familia, entre las que se incluyen rutas de señalización y la homeostasis proteica (Henderson, 2010). Además, se han producido numerosos avances en la evaluación en distintas especies de la respuesta de estos genes ante diferentes situaciones de estrés medioambiental, incluyendo la presencia de tóxicos (Dang y col., 2010; Karouna-Renier y Rao, 2009; Rhee y col., 2009; Ming y col., 2010; Simoncelli y col., 2010; Sinha y col., 2010; Waagner y col., 2010; Zhanng y Denlinger, 2010), habiendo quedado demostrada la capacidad de los mismos de inducir la producción de algunas HSPs.

Uno de los resultados más interesantes dentro del estudio de las HSPs recae sobre el gen *hsp70*. El patrón de expresión de *hsp70* sufrió alteraciones similares ante las exposiciones de las larvas tanto a DEHP como a BBP. Por un lado, ambos compuestos produjeron una fuerte sobreexpresión a las 24 horas en las concentraciones más altas, aumentando más del doble en el DEHP y llegando con el BBP a niveles cuatro veces superiores a los observados en larvas no tratadas. Este resultado admite varias interpretaciones. Por un lado, conviene destacar que la inducción por BBP observada a dosis altas es similar a la descrita en larvas sometidas a choque térmico (aproximadamente del 400%), descrita con anterioridad en la literatura. Sin embargo, no se han observado determinadas alteraciones típicas de la respuesta mediada por choque térmico a nivel citológico sobre cromosomas politénicos de *C. riparius*, lo que apunta a que la respuesta que desencadena el BBP es distinta a la descrita para el choque térmico. En el caso del DEHP la inducción del gen *hsp70* es menor y el resto de proteínas de choque térmico estudiadas no se comportan como la respuesta de estrés térmico, lo que sugiere que la respuesta de este gen es muy específica en exposiciones a este compuesto y no se trata de una respuesta general frente a una situación de estrés celular. Por otro lado, no hay que olvidar el papel que algunas HSPs juegan en el correcto plegamiento del receptor de la ecdisona. En vertebrados, las HSPs están involucradas en la estabilización y activación del receptor de la hormona esteroidea (Gillesby y Zacharewski, 1998), por

lo que si desempeñasen funciones similares en artrópodos los cambios en los niveles de expresión de estos genes, especialmente *hsp70*, podrían traer consigo la alteración de la ruta hormonal mediada por ecdisona, al influir sobre el receptor de esta hormona (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003).

Por último, en relación con *hsp70*, exposiciones más prolongadas a las concentraciones más bajas produjeron una represión significativa de este gen, llegando a reducirse en un 70% a las 96 horas de exposición a DEHP. En ambos casos, tanto en la sobreexpresión como en la represión, a igualdad de condiciones experimentales (tiempo y concentración) el efecto del BBP fue mayor, lo que confirma de nuevo la mayor capacidad tóxica de este ftalato.

En contraste con estos resultados, es importante destacar que ninguna de las condiciones experimentales produjo alteraciones en los niveles de expresión de *hsc70*. Esto sugiere que los tratamientos ensayados con los tóxicos no son capaces de inhibir la actividad normal de este gen constitutivo, el cual parece mostrar una robusta resistencia a los efectos de estos tóxicos y una regulación diferencial con respecto a su homólogo inducible. Nuestros resultados concuerdan con el hecho de que las proteínas constitutivas de 70 kDa desarrollan funciones *housekeeping* en la célula, relacionadas con el ensamblaje de proteínas, su plegamiento, traslocación y desnaturalización (Feder y Hoffman, 1999). Por tanto, el hecho de que *hsc70* no resulte alterado en ninguno de los tratamientos ensayados resalta el comportamiento específico del gen *hsp70* y refuerza el valor del índice *hsc70/hsp70* como biomarcador sensible a ftalatos.

Sorprendentemente, los dos ftalatos estudiados produjeron efectos antagónicos en el caso de los demás genes de choque térmico analizados. Aunque en las primeras 24 horas tanto *hsp40* como *hsp27* tuvieron un comportamiento similar en ambos compuestos, con la ligera represión del primero y la sobreexpresión del segundo, a las 48 horas de exposición ambos se sobreexpresaron en las exposiciones a DEHP y se reprimieron en las exposiciones a BBP.

Resulta destacable la respuesta de *hsp27* en las primeras 24 horas de contacto con los ftalatos, ya que el aumento detectado en sus niveles de expresión fue contrario a la respuesta ofrecida por todos los demás genes analizados en este trabajo. Dado que se ha descrito la participación de este gen en procesos de resistencia a distintos tóxicos y situaciones de estrés (Feder y Hoffman, 1999), es probable que dicho aumento se fundamente en este papel protector, gracias al cual las células tratarían de desencadenar los mecanismos necesarios para mitigar unos daños que, según los resultados arrojados por los demás genes de choque térmico, distarían de ser severos.

Este resultado concuerda con las alteraciones sobre el patrón de expresión génica descritas previamente en algunos organismos frente a la exposición a compuestos tóxicos. La respuesta de las células frente a la presencia de tóxicos puede conducir a la sobreexpresión de determinados genes relacionados con los mecanismos de defensa frente al estrés (Park y col., 2008a) y/o la disminución de la actividad normal del resto de los genes, con el fin de evitar el daño (Peterson y Bain, 2004).

De manera general, todos los genes de respuesta a estrés analizados se activaron, en mayor o menor grado, tras mantener sin droga a las larvas durante 24 horas una vez retirados los compuestos del medio de cultivo, con la única salvedad de *hsp27*. Estos resultados podrían relacionarse con el hecho de que no se ha descrito ninguna actividad como chaperona para HSP27, mientras que esta actividad si estaría presente en las demás proteínas de choque térmico analizadas. Estarían, por tanto, implicadas en los procesos de plegamiento de multitud de proteínas y su aumento se correlacionaría con una mayor síntesis proteica encaminada a alcanzar la homeostasis celular, esperable tras la retirada de los tóxicos y que en el caso del DEHP se ejemplifica con el aumento en la actividad transcripcional del gen ribosómico *rpl13*.

En la actualidad, tanto el DEHP como el BBP se encuentran catalogados como contaminantes emergentes con capacidad de alterar el sistema endocrino a través de distintas vías, incluyendo la epigenética (NTP-CERHR, 2003, 2006). Además, ambos han demostrado ser tóxicos tanto para la reproducción como para el desarrollo, existiendo evidencias experimentales que demuestran su actividad endocrina en humanos y otros modelos de mamíferos (Lyche y col., 2009).

#### *Rutas endocrinas*

Los disruptores endocrinos (EDCs) pueden mimetizar a estrógenos y andrógenos a través los receptores hormonales o influyendo en las rutas de señalización celular. De este modo, pueden bloquear, prevenir y alterar la unión de la hormona a sus receptores o modificar las rutas de señalización, alterar la producción y eliminación de las hormonas naturales y modificar los niveles y funciones de los receptores hormonales (Soto y col., 1995).

Los ecdisteroides, como la ecdisona, juegan un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y la embriogénesis en artrópodos (Sekimoto y col., 2006; Lafont y Mathieu, 2007). Estudios previos han demostrado la capacidad de muchos contaminantes ambientales de actuar como agonistas o antagonistas de las hormonas esteroideas en invertebrados (Janer y Porte, 2007), pudiendo modular sus perfiles de



expresión y produciendo así alteraciones en los mecanismos de regulación hormonal. Es el caso, por ejemplo, de la inhibición de la muda (Zou y Fingerman, 1997) y del desarrollo (Mu y col., 2005) por el efecto antagonista detectado en *Daphnia magna*, las alteraciones en la reproducción, el crecimiento y la diferenciación sexual en crustáceos (Rodríguez y col., 2007), la sobreexpresión del receptor de la progesterona en ratas (Funabashi y col., 2001), de la hormona tiroidea en células de *Xenopus* (Iwamuro y col., 2006), de los receptores de estrógenos y andrógenos en células de ratón (Ritcher y col., 2007) y del receptor hormonal de la ecdisona en *Chironomus* (Planelló y col., 2008), así como el efecto mimético en este mismo organismo sobre este receptor (Planelló y col., 2010).

Los receptores nucleares (NRs) comprenden una superfamilia de proteínas que desarrollan funciones críticas en el sistema hormonal. Los receptores hormonales nucleares son factores de transcripción que controlan rutas fisiológicas y del desarrollo fundamentales (Mangelsdorf y col., 1995), mientras que los receptores relacionados con los estrógenos (ERRs) son un grupo de receptores nucleares que fueron identificados originalmente por la similitud de sus secuencias con las de los receptores de estrógenos (ERs). Ambos, ERRs y ERs, solapan en sus afinidades por coactivadores y los lugares de unión a ADN, pero se diferencian notablemente en cuanto a su unión al ligando y activación (Giguère, 2002).

Un objetivo importante en esta tesis se ha encaminado a intentar detectar potenciales dianas celulares y moleculares relacionadas con el efecto tóxico temprano de estos dos ftalatos en el sistema endocrino de los insectos. Para ello se analizaron los niveles de expresión del gen *EcR*, responsable de la activación de la cascada transcripcional que controla la muda y la metamorfosis en insectos. Por otro lado, en el caso del BBP también se analizó la expresión del gen *ERR*, que codifica para un receptor relacionado con estrógenos y para el cual se cuenta con muy limitada información hasta la fecha.

Uno de los resultados mas interesantes en relación con la ruta hormonal es el cambio que el BBP es capaz de producir sobre el gen *EcR* en las larvas expuestas, en comparación con larvas no tratadas. El BBP induce de manera significativa los niveles de transcrito del receptor de la ecdisona tras 24 horas de exposición a las concentraciones más altas estudiadas. Estos datos sugieren que en *Chironomus* se produce un efecto temprano y específico del BBP sobre el gen *EcR* y constituye la primera observación a nivel molecular de la interacción de un ftalato con el receptor hormonal de la ecdisona en insectos. Contrariamente, el DEHP no produjo ningún efecto disruptor endocrino sobre el *EcR* en las mismas condiciones de ensayo, lo que demuestra claramente que aun siendo de la misma naturaleza química tienen distinta afinidad por el receptor de la ecdisona.



Dado que el receptor nuclear es un factor clave en la transducción de la señal hormonal en el interior celular, estos resultados proporcionan la evidencia de que los ftalatos son capaces de interactuar de manera directa con la ruta endocrina de insectos. La inducción directa de *EcR* por la ecdisona proporciona un bucle regulador que hace aumentar los niveles de receptor en respuesta a la hormona ligando (Koelle y col., 1991). En este sentido, la interacción del BBP sobre el gen *EcR* podría deberse a la capacidad del BBP de imitar el comportamiento de la forma activa de la ecdisona (20E).

Frente al efecto observado tras las primeras 24 horas de tratamiento, exposiciones más prolongadas en las concentraciones más bajas tuvieron como consecuencia el efecto contrario, provocando ambos compuestos la represión de este gen. Esto sugiere, para ambos compuestos, que el descenso en la actividad transcripcional de *EcR* podría deberse a un efecto tóxico general de los ftalatos.

Por último, en relación a la disrupción endocrina cabe resaltar el diferente efecto detectado en los estudios de toxicidad retardada con los dos ftalatos, donde la retirada de la droga del medio llevó a una sobreexpresión significativa tanto de *EcR* como de *ERR* en el caso del BBP, mientras que en los tratamientos equivalentes con DEHP no se alcanzaron los valores del control y el receptor de la ecdisona se mantuvo significativamente reprimido. Esto último es especialmente destacable, teniendo en cuenta que los tratamientos de 24 horas con DEHP no mostraron ninguna alteración de esta diana, lo que evidencia el hecho de que algunos efectos tóxicos no se manifiesten de manera inmediata en un organismo.

#### *Metabolismo energético y de detoxificación*

En Ecotoxicología, dianas clásicas de toxicidad como la supervivencia, el crecimiento o la reproducción pueden en última instancia reflejar alteraciones en el metabolismo energético de los individuos (Servia y col., 2006). Por ejemplo, se ha demostrado en diversos animales acuáticos que la exposición a cobre afecta a distintos parámetros fisiológicos, como el consumo de oxígeno, variables sanguíneas y la eficiencia energética (EPA, 2003), con probables consecuencias en el estado de los individuos y en su ciclo de vida.

Por otro lado, la habilidad metabólica de un organismo para llevar a cabo los procesos de detoxificación está directamente relacionada con los efectos tóxicos que los xenobióticos pueden ejercer sobre el mismo. La alteración de los sistemas enzimáticos que protegen a las células ante la exposición a sustancias perjudiciales puede condicionar el correcto funcionamiento de los procesos de eliminación de un tóxico tras su metabolización y la capacidad de una sustancia para bioacumularse. Alteraciones en estos sistemas llevan

asociados daños celulares ante los que un organismo puede adaptarse, por ser leves o pasajeros, o bien sucumbir cuando la homeostasis celular se ve seriamente comprometida.

La capacidad de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de obtener energía y poder reductor a través de la glucólisis se ha visto complementada en los últimos años con su implicación en distintos procesos de carácter no metabólico. Entre ellos se encuentran la inducción de la apoptosis, la reparación del ADN y el transporte, ya sea de ARNt, de vesículas desde el retículo al Golgi o de distintos componentes celulares a través de los axones neuronales (Sawa y col., 1997; Sirover, 1997; Laschet y col., 2004; Tarze y col., 2007; Zala y col., 2013). Su variedad funcional se encuentra asociada a sus múltiples localizaciones intracelulares, habiéndose encontrado en el citosol, el núcleo, el sistema de vesículas entre el retículo y el Golgi y la mitocondria, así como asociada a la membrana plasmática (Ryzlak y Pietruszko, 1988; Tisdale y col., 2007).

Como se ha dicho con anterioridad, el gen que codifica para esta enzima se ha considerado tradicionalmente un buen gen de referencia en estudios de expresión (Carnahan y col., 2013; Sirakov y col., 2013), dado que es normalmente estable y se expresa de manera constitutiva y con altos niveles en la mayoría de tejidos y células. Sin embargo, hay que destacar que en los últimos años distintos autores han descrito la regulación diferencial de este gen bajo condiciones específicas (Shen y col., 2010; Wang y Xu, 2010), como podría ser el efecto de xenobióticos.

En este sentido, la exposición de las larvas de *Chironomus* a los dos ftalatos estudiados en el presente trabajo no parece tener un efecto temprano sobre los niveles de transcrito de la enzima GAPDH aunque, sin embargo, sí se observó en ambos casos la disminución de la actividad del gen *GAPDH* tras exposiciones largas. Esta represión llegó a ser drástica a las 96 horas en el caso del DEHP.

Estos resultados ponen de manifiesto que el metabolismo energético de *C. riparius* puede resultar alterado por la exposición a DEHP y BBP. Es probable que esta reducción en una ruta directamente implicada en la obtención de energía afecte a otros sistemas celulares, haciendo que el organismo trate de adaptarse a una situación de precariedad energética. De hecho, la casi total represión detectada en los tiempos más largos de exposición al DEHP puede estar directamente relacionada con el descenso en la movilidad de las larvas que se reflejó con anterioridad, así como en la pérdida de coloración de las mismas. Las larvas encuentran rutas alternativas para obtener la energía necesaria para mantener sus funciones vitales mínimas, hecho que se refleja en la nula mortalidad detectada en los estudios de supervivencia en las mismas condiciones experimentales.

Se piensa que las familias multigénicas que codifican para los citocromos P450, las glutatión S-transferasas y las esterasas proporcionan a los animales los medios para burlar los cambios medioambientales provocados por xenobióticos (Le Goff y col., 2006).

La monooxigenasa dependiente del citocromo P450 se ha detectado en todos los organismos examinados, de bacterias a mamíferos, y representa el sistema enzimático más importante en lo que a la detoxificación de xenobióticos se refiere. En insectos, este sistema resulta crucial en la regulación de los niveles de moléculas endógenas, como hormonas, ácidos grasos y esteroides, así como en la biotransformación de xenobióticos y pesticidas (Scott, 1999). Las enzimas P450 se encuentran asimismo en las rutas de biosíntesis de las hormonas ecdisteroideas y juvenil, las cuales juegan un papel fundamental en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de los insectos (Feyereisen, 1999).

Este sistema enzimático ha demostrado ser inducible tras la exposición de los organismos a gran variedad de compuestos químicos, entre los que se incluyen algunas de las principales clases de contaminantes ambientales (Scott, 1999; Hoffman y col., 1995). Esta inducción se produce a través de un mecanismo controlado a nivel transcripcional (Batar y col., 1997), dando como resultado un aumento en la actividad de la enzima que puede proporcionar cierta versatilidad en la adaptación de los insectos a su ambiente (Terriere, 1984). En el caso de *C. riparius*, se ha descrito la activación de este gen por la exposición al biocida tributilestaño (TBT), aunque no por los compuestos fenólicos nonilfenol o bisfenol A (Martínez-Paz y col., 2012).

Dado que este sistema enzimático juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos, su inducción medida a escala molecular proporciona la información genética necesaria para evaluar las potenciales consecuencias de la exposición de organismos acuáticos a contaminantes (Londoño y col., 2004).

Por otro lado, los biomarcadores que emplean medidas de la actividad enzimática para detectar bajos niveles de contaminantes están siendo cada vez más utilizados en las evaluaciones del riesgo de ecosistemas acuáticos (Callaghan y col., 2002). Gracias a ellos es posible identificar la incidencia y los efectos de la exposición a xenobióticos, proporcionando una alerta temprana de sus potenciales efectos dañinos incluso en los niveles más altos de organización biológica (McCarthy y Shugart, 1990).

Las glutatión S-transferasas (GSTs) constituyen una familia diversa de enzimas multifuncionales de detoxificación de fase II, se han encontrado en casi todos los organismos vivos y son también un biomarcador bioquímico popular, capaz de detectar la presencia de diversos xenobióticos a partir de la medida de su inducción (Motoyama

y Dauterman, 1977; Usui y col., 1977; Clark y col., 1986; Ladagic y col., 1994). En insectos, los estudios sobre estas enzimas se han centrado principalmente en su papel a la hora de conferir resistencia a insecticidas (Enayati y col., 2005) y en respuesta al estrés oxidativo (Zou y col., 2000). Pueden asimismo unirse a compuestos hidrofóbicos y facilitar el secuestro, almacenamiento y transporte de drogas, hormonas y otros metabolitos (Hayes y Pulford, 1995).

Relacionada con la actividad de la enzima GST la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) puede contribuir a la defensa frente al daño oxidativo mediante la prevención y la reparación del daño de los productos secundarios generados por las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de relieve la posibilidad de que los efectos inhibitorios sobre la expresión de *CYP450* producidos por los ftalatos analizados, ya desde las 24 horas de exposición en el caso del DEHP, estén relacionados con la represión provocada por ambos compuestos en el receptor de la ecdisona (*EcR*) en las mismas condiciones experimentales. Algunos xenobióticos son capaces de reprimir la expresión de distintos genes de la familia *CYP4* en *Drosophila melanogaster* y en el lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Davies y col., 2006). Otros se sobreexpresan o se reprimen por el efecto de ecdisteroides, lo que sugiere cierta regulación hormonal de los mismos. Asimismo, varios de estos genes están involucrados en el metabolismo de la hormona del desarrollo (Aragon y col., 2001). Todo ello lleva a pensar en la existencia de interacciones entre las exposiciones a determinados químicos y la función endocrina, en lo que a la respuesta de algunos citocromos se refiere (Le Goff y col., 2006).

La represión de la actividad transcripcional del citocromo vino acompañada de un descenso en la actividad enzimática de GST, significativa en ambos compuestos en exposiciones de 48 horas y en los estudios de toxicidad retardada. Asimismo, se detectó un descenso significativo en la expresión del gen de la glutatión peroxidasa (GPx) a las 48 horas de tratamiento con BBP. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto inhibitor de los ftalatos estudiados sobre los distintos sistemas de detoxificación celulares estudiados, tanto los englobados dentro de la fase I como los correspondientes a las enzimas de la Fase II de estas rutas metabólicas.

En los estudios de toxicidad retardada ambos ftalatos provocaron la sobreexpresión del gen *CYP450*. Dicha sobreexpresión resultó directamente proporcional a la represión detectada tras la exposición a los compuestos en el tiempo más corto analizado, es decir, cuanta más represión provocó el compuesto en las primeras 24 horas en contacto con las larvas, más sobreexpresión se detectó en las 24 horas siguientes sin contacto con

el xenobiótico. Nuestros resultados apuntan en la dirección de una activación de los sistemas de detoxificación tras la retirada de los compuestos del medio, lo que podría interpretarse como una respuesta adaptativa de nuestro organismo de estudio, que trataría de contrarrestar los efectos tóxicos del DEHP y el BBP mediante la activación de rutas metabólicas que lleven a su eliminación y que permitan a la célula restaurar sus condiciones normales.

### *Poblaciones de laboratorio vs. poblaciones de campo*

Los potenciales efectos adversos sobre la fauna silvestre de una cada vez mayor cantidad de compuestos antropogénicos eliminados en el medio ambiente como residuos han cobrado gran importancia, tanto en lo concerniente a la salud ambiental como en lo que respecta a los riesgos sobre la salud humana. Amén de la preocupación causada por las sustancias individuales, se consideran cada vez más importantes los efectos producidos por las mezclas múltiples de sustancias, que suponen una aproximación más realista a las condiciones que se pueden encontrar en las aguas contaminadas.

Los organismos acuáticos están expuestos de manera permanente a gran variedad de contaminantes ambientales, muchos de los cuales se consideran persistentes. En estos ambientes la fauna béntica resulta de gran importancia, dado que representa una parte importante de la red alimenticia y además puede bioacumular determinados contaminantes, como metales, y servir de entrada de los mismos en la cadena trófica (Bouché y col., 2000). En este sentido, uno de los retos a los que se enfrenta la Ecotoxicología es llegar a comprender las respuestas biológicas de poblaciones naturales de organismos acuáticos, expuestas a una gran variedad de contaminantes químicos, así como mejorar las herramientas de control de la calidad del agua, capaces de detectar efectos subletales en comunidades biológicas expuestas a tóxicos.

Aunque la aproximación más tradicional a estos efectos se ha centrado en el análisis de la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción, tanto en poblaciones naturales como en organismos modelo en laboratorio (Faria y col., 2008; Paumen y col., 2008), nuevas líneas de investigación focalizadas en parámetros moleculares revelan información acerca de dianas celulares específicas, capaces de arrojar luz sobre el modo de acción de los tóxicos analizados y los mecanismos de respuesta aguda y/o crónica de los organismos expuestos a estos compuestos en ambientes contaminados. Además, han demostrado ser herramientas de gran utilidad marcadores bioquímicos como la medida de distintas actividades enzimáticas (Jemec y col., 2010; Damasio y col., 2010), y distintos marcadores génicos capaces de aportar de manera rápida y sensible información sobre los compuestos de estudio (Steinberg y col., 2008). Sin embargo, el escaso conocimiento

de los genomas de invertebrados acuáticos hace que en la actualidad todavía sean pocos los estudios que tratan de analizar desde un punto de vista ecotoxicogenómico el comportamiento de estas poblaciones naturales en sus ambientes contaminados, habiéndose llevado a cabo los avances más importantes en distintas especies de peces (Costa y col., 2011).

Aunque el desarrollo de biomarcadores requiere un trabajo experimental previo en condiciones controladas de laboratorio, de manera que se puedan identificar respuestas específicas a determinados compuestos químicos, resulta necesaria su validación posterior en poblaciones naturales expuestas a una mezcla compleja de contaminantes antes de poder sacar conclusiones acerca de su utilidad en escenarios reales.

En el presente trabajo se analizaron por vez primera los efectos específicos de dos tóxicos, ftalatos en este caso, sobre larvas de *Chironomus riparius* que proceden de poblaciones naturales y que, previamente al contacto con estos tóxicos, tienen sus sistemas metabólicos adaptados a las condiciones físico-químicas del nicho ecológico que habitan.

Nuestros resultados muestran que la exposición de las larvas de campo a los dos ftalatos estudiados no alteró de manera significativa la tasa de supervivencia de las mismas, siendo el DEHP más tóxico en tiempos más largos (48h). A pesar de la falta de significación estadística, las larvas de poblaciones naturales resultaron ser más sensibles a los efectos de estos compuestos, en comparación con los experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones con las larvas de laboratorio.

Los estudios de los distintos marcadores celulares seleccionados mostraron respuestas bien diferenciadas por parte de los dos ftalatos. De manera general, mientras el DEHP originó principalmente la represión de los genes analizados, el BBP tuvo precisamente el efecto contrario, provocando casi siempre una fuerte sobreexpresión de los mismos.

En cuanto a la respuesta celular de estrés, el DEHP reprimió significativamente la expresión de *hsc70* en los experimentos de 48 horas (incluyendo los de recuperación), mientras que las larvas de laboratorio no habían mostrado alteraciones en esta diana. La capacidad de alterar este gen constitutivo vino acompañada de una fuerte sobreexpresión de su variante inducible en los tratamientos de recuperación, desencadenando así una respuesta de estrés similar a la observada para estas condiciones en los experimentos de laboratorio. En el caso del BBP, por el contrario, el contacto con el xenobiótico produjo en las larvas una fuerte sobreexpresión de *hsp70* ya desde las primeras 24 horas, de más de diez veces los valores del control y más de tres veces superior al mayor efecto

provocado por el DEHP. Además, el BBP también indujo la sobreexpresión de *hsc70* en los tiempos más largos estudiados. Las alteraciones inducidas por estos ftalatos en el gen *hsc70* contrastan con la estabilidad de este gen en las poblaciones de laboratorio.

También fueron diferentes los efectos de los ftalatos sobre la ruta hormonal. Mientras que el DEHP reprimió tanto al gen *EcR* como al *ERR* en todas las condiciones estudiadas, de manera especialmente severa en el caso del primero, el BBP indujo la sobreexpresión de ambos genes en los estudios de 48 horas, tras una primera represión no significativa en las primeras 24 horas. La incapacidad de las larvas de recuperar los niveles de expresión de *EcR* de los controles tras la retirada del DEHP del medio fue similar a lo observado con las poblaciones del laboratorio. Sin embargo, en el caso del BBP se produjo una sobreexpresión a las 48 horas, mientras que en las larvas de laboratorio este gen permanecía significativamente reprimido en este tiempo.

Por último, ambos compuestos mostraron también un comportamiento tóxico distinto al analizar sus efectos sobre el metabolismo de detoxificación. Aunque la actividad enzimática de GST no se vio significativamente afectada por ninguno de ellos en las condiciones estudiadas, el análisis de los niveles de expresión de CYP450 mostró claras diferencias entre los ftalatos. Por un lado, el DEHP produjo en todos los casos una fuerte represión en los niveles de expresión de este gen, produciendo un daño que las larvas no eran capaces de revertir en los estudios de recuperación y llegando a inhibir por completo este gen en los tratamientos más largos. Por otro lado, el BBP produjo una fuerte sobreexpresión del gen en todas las condiciones, evidenciando así la notable activación del metabolismo de detoxificación de Fase I a causa de la exposición a este compuesto.

Los resultados obtenidos confirman la necesidad de llevar a cabo estudios en diferentes poblaciones para tener una aproximación más completa sobre las dianas de efecto que se ven alteradas por cada compuesto, así como al tipo de respuesta que son capaces de producir en función de las circunstancias particulares de un escenario real (ecosistemas naturales en los que las larvas están sometidas de forma crónica a mezclas complejas de tóxicos).



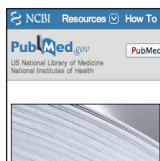


# CONCLUSIONES



- En términos de supervivencia, el BBP es un compuesto más tóxico que el DEHP para las larvas de *Chironomus riparius*; sin embargo, hay que resaltar que en las poblaciones de campo ensayadas resultó ser a la inversa.
- Tratamientos agudos de BBP en condiciones en las que la exposición no provoca mortalidad significativa producen cambios en la morfología de los cromosomas politénicos, afectando de forma especial a los centrómeros de los cromosomas y al anillo de Balbiani BR2, el locus más activo en las células politenizadas.
- La evaluación de los perfiles de expresión de una amplia representación de genes ha revelado la existencia de efectos genómicos de estos ftalatos, que se manifiestan por la rápida activación y/o inhibición de determinados genes implicados en la biogénesis de ribosomas, la respuesta celular de estrés, el metabolismo energético, las vías de detoxificación y la ruta de señalización hormonal en las células.
- Se han encontrado notables diferencias en la respuesta de los diferentes genes, incluso relacionados dentro de una misma ruta celular, frente a un determinado ftalato. Asimismo, existen diferencias significativas en el efecto de cada uno de los ftalatos sobre un mismo gen. Por tanto, es posible identificar dianas específicas.
- La función nucleolar se ha mostrado especialmente sensible al BBP, por lo que se plantean el ARNr y las proteínas ribosómicas como dianas potenciales del efecto temprano de este ftalato. Por el contrario, la exposición a DEHP no parece alterar significativamente la biogénesis ribosomal.
- Ambos compuestos desencadenan una respuesta de estrés celular que se manifiesta, fundamentalmente, a través de una fuerte sobreexpresión del gen *hsp70* en las concentraciones más altas. En el caso de otros genes de choque térmico, exposiciones prolongadas a DEHP provocaron un aumento de la expresión, mientras que tuvieron el efecto contrario en el caso del BBP. Por tanto, la respuesta de estrés tóxico se diferencia de la clásica descrita para choque térmico, en la que esta familia de genes se expresa de manera coordinada.

- El BBP es capaz de activar el gen del receptor de la ecdisona, lo que indica que puede alterar la ruta de señalización endocrina. Estos resultados muestran por primera vez en invertebrados la capacidad de este ftalato para mimetizar la acción de la ecdisona, un elemento clave para la metamorfosis y el desarrollo. Este efecto se manifiesta claramente tanto en exposiciones cortas como en la recuperación tras pulsos cortos y va acompañado de la activación del receptor relacionado con estrógenos (ERR). No se ha detectado un efecto similar por parte del DEHP en las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, en exposiciones prolongadas ambos ftalatos han demostrado tener la capacidad de alterar la ruta endocrina, inhibiendo la expresión del gen del receptor de la ecdisona (EcR).
- Ambos compuestos ralentizan de manera general el metabolismo de detoxificación de las larvas de *Chironomus* al inhibir en exposiciones prolongadas la actividad de la enzima GST y la expresión de los genes CYP450 y GPx.
- Los resultados de toxicidad retardada muestran la capacidad tanto del DEHP como del BBP de desencadenar efectos tóxicos tiempo después de haberse producido la exposición a estos compuestos. Cabe destacar la capacidad del DEHP de alterar la ruta endocrina de manera permanente, sin que los niveles de expresión del gen EcR se recuperen transcurrido un tiempo tras la exposición.
- El estudio con larvas de poblaciones naturales de ríos muestra diferencias, tanto en la toxicidad de los dos ftalatos como en el comportamiento de algunas dianas, con respecto a las poblaciones de laboratorio que no habían estado previamente expuestas a contaminantes ambientales. Estos datos sugieren la necesidad de llevar a cabo estudios en diferentes poblaciones para contar con una imagen más completa de los efectos potenciales de los tóxicos en función de las características concretas de los organismos en un escenario real de exposición.



Aquatic Toxicology

Contents lists available at ScienceDirect

**Aquatic Toxicology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquattox](http://www.elsevier.com/locate/aquattox)

**Effects of butyl benzyl phthalate on the aquatic larvae of the zebrafish (*Danio rerio*) related to the endocrine system**

María Herrero<sup>1</sup>, José Luis Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, Spain

**ABSTRACT**

In this work, the effects of butyl benzyl phthalate (BBP), one of the most extensively used plasticizers, on the development of zebrafish larvae (*Danio rerio*) were studied. BBP was tested at concentrations of 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µg/L. The results showed that BBP caused a significant increase in the mortality of the larvae, as well as a decrease in the hatching time. Gene expression was analyzed using specific gene probes. The expression of the *hsp70* gene, a marker of stress, was significantly increased in the larvae exposed to BBP. The expression of the *hsp90* gene, a marker of the endocrine system, was also significantly increased. The results suggest that BBP acts as an endocrine disruptor in zebrafish larvae. The potential effect of BBP on the endocrine system of the zebrafish larvae was also studied using the *hsp90* gene as a marker. The results showed that BBP caused a significant increase in the expression of the *hsp90* gene, suggesting that BBP acts as an endocrine disruptor in zebrafish larvae. The results also showed that BBP caused a significant increase in the mortality of the larvae, as well as a decrease in the hatching time. The results suggest that BBP acts as an endocrine disruptor in zebrafish larvae.

Phthalates, a family of aromatic dicarboxylic acid, are a family of chemicals typically used as plasticizers to increase the flexibility of plastic polymers, mainly polyvinyl chloride (PVC). Phthalates are also used as solvents in a huge variety of industrial products, including detergents, building materials, insecticides, and medical devices. Their high production and widespread use in consumer products have led to concerns about their potential health effects. In this paper, we have studied the effects of butyl benzyl phthalate (BBP) on the development of zebrafish larvae (*Danio rerio*).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

# BIBLIOGRAFÍA



- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud J-P. (2006) cDNA cloning and gene expression of ribosomal S9 protein gene in the mollusk *Corbicula fluminea*: a new potential biomarker of metal contamination up-regulated by cadmium and repressed by zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 527–33.
- Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. (2012) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ -crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:1622–31; doi:10.1016/j.biocel.2012.04.002.
- Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2004) Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:775–80; doi:10.1073/pnas.0305977101.
- Akyol S, Gercel-Taylor C, Reynolds LC, Taylor DD. (2006) HSP-10 in ovarian cancer: expression and suppression of T-cell signaling. *Gynecol. Oncol.* 101:481–6; doi:10.1016/j.ygyno.2005.11.014.
- Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. (1982) Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* 45: 19–25.
- Albro PW, Thomas RO. (1973) Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 306:380–90; doi:10.1016/0005-2760(73)90176-8.
- Aliza D, Tey C-L, Ismail IS, Kuah M-K, Shu-Chien AC, Muhammad TST. (2012) The ribosomal protein L19 mRNA is induced by copper exposure in the swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. *Mol. Biol. Rep.* 39:4823–9; doi:10.1007/s11033-011-1275-3.
- Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76:160–202; doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015.
- Andrady AL, Neal M a. (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:1977–84; doi:10.1098/rstb.2008.0304.
- Ankley GT, Bencic DC, Breen MS, Collette TW, Conolly RB, Denslow ND, et al. (2009) Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat. Toxicol.* 92:168–78; doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.013.
- Ankley GT, Schubauer-Berigan MK. (1994) Comparison of techniques for the isolation of sediment pore water for toxicity testing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27; doi:10.1007/BF00214842.
- Aragon S, Claudinot S, Blais C, Maibèche M, Dauphin-Villemant C. (2002) Molting cycle-dependent expression of CYP4C15, a cytochrome P450 enzyme putatively involved in ecdysteroidogenesis in the crayfish, *Orconectes limosus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 153–9.
- Asselman J, Glaholt SP, Smith Z, Smagghe G, Janssen CR, Colbourne JK, et al. (2012) Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 110-111:54–65; doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.010.
- ASTM (2010) *ASTM E1706 Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. ASTM International, West Conshohocken.

- Athanasas-Platsis S, Corcoran CM, Kaye PL, Cavanagh AC, Morton H (2000) Early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43: 223–33.
- ATSDR (2002) *Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Aziz JB, Akrawi NM, Nassori GA (1991) The effect of chronic toxicity of copper on the activity of Balbiani rings and nucleolar organizing region in the salivary gland chromosomes of *Chironomus ninevah* larvae. *Environ. Pollut.* 69: 125–30.
- Batard Y, Schalk M, Pierrel MA, Zimmerlin A, Durst F, Werck-Reichhart D (1997) Regulation of the Cinnamate 4-Hydroxylase (CYP73A1) in Jerusalem Artichoke Tubers in Response to Wounding and Chemical Treatments. *Plant Physiol.* 113: 951–959.
- Baurén G, Wieslander L (1994) Splicing of Balbiani ring I gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76: 183–92.
- Beato M (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J.* 5: 2044–51.
- Beermann W (1971) Effect of -amantine on puffing and intranuclear RNA synthesis in *Chironomus* salivary glands. *Chromosoma* 34: 152–67.
- Berger EM, Goudie K, Klieger L, Berger M, DeCato R (1992) The juvenile hormone analogue, methoprene, inhibits ecdysterone induction of small heat shock protein gene expression. *Dev. Biol.* 151: 410–8.
- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53: 409–35; doi:10.1146/annurev.
- med.53.082901.104018.
- Bettinetti R (2000) *Invertebrati bentonici per la valutazione dell'ecotossicità dei sedimenti. Tesi di Dottorato*. Università degli Studi di Milano.
- Bleeker EA., Geest HG van der, Kraak MH., Voogt P de, Admiraal W (1998) Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 41: 51–62; doi:10.1016/S0166-445X(97)00070-2.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of Xenoestrogenic Environmental Pollutants on the Proliferation of a Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 306–310; doi:10.1007/s002449900322.
- Board PG, Menon D (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3267–88; doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.019.
- Boisvert F-M, Koningsbruggen S van, Navascués J, Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 574–85; doi:10.1038/nrm2184.
- Bolt HM, Ros PH (2008) Generation of reactive intermediates by cytochromes P450. En *Cytochromes P450. Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics. Issues in Toxicology* (C. Ioannides ed. ), pp. 46–94. RSC Publishing, Cambridge.
- Bouché ML, Habets F, Biagianni-Risbourg S, Vernet G (2000) Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46: 246–51; doi:10.1006/eesa.2000.1919.
- Brattsten LB, Holyoke CW, Leeper JR, Raffa KF (1986) Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research.



- Science 231:1255–60; doi:10.1126/science.231.4743.1255.
- Brown D, Thompson RS, Stewart KM, Croudace CP, Gillings E (1996) The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. *Chemosphere* 32:2177–2187; doi:http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(96)00128-2.
- Browning C, Martin E, Loch C, Wurtz J-M, Moras D, Stote RH y col. (2007) Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor. *J. Biol. Chem.* 282:32924–34; doi:10.1074/jbc.M705559200.
- Burger J (1997) Heavy metals and selenium in herring gulls (*Larus argentatus*) nesting in colonies from eastern Long Island to Virginia. *Environ. Monit. Assess.* 48: 285–296.
- Burger J, Gochfeld M (2001) On developing bioindicators for human and ecological health. *Environ. Monit. Assess.* 66: 23–46.
- Cadogan DF, Papez M, Poppe AC, Pugh DM, Scheubel J (1994) An assessment of the release, occurrence and possible effects of plasticisers in the environment. *Prog. Rubber Plast. Technol.* 10.
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247: 295–311.
- Call DJ, Markee TP, Geiger DL, Brooke LT, VandeVenter FA, Cox DA, et al. (2001) An assessment of the toxicity of phthalate esters to freshwater benthos. I. Aqueous exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1798–804.
- Callaghan A, Fisher TC, Grosso A, Holloway GJ, Crane M (2002) Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52:128–33; doi:10.1006/eesa.2002.2160.
- Cammack JN, White RD, Gordon D, Gass J, Hecker L, Conine D y col. (2003) Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats. *Int. J. Toxicol.* 22: 159–74.
- Capó MA (2002) Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. En *Principios de Ecotoxicología* McGraw-Hill, Madrid.
- Carnahan MN, Veazey KJ, Muller D, Tingling JD, Miranda RC, Golding MC (2013) Identification of cell-specific patterns of reference gene stability in quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction studies of embryonic, placental and neural stem models of prenatal ethanol exposure. *Alcohol* 47:109–20; doi:10.1016/j.alcohol.2012.12.003.
- Carnevali O, Tosti L, Speciale C, Peng C, Zhu Y, Maradonna F (2010) DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *M. Polymenis ed. PLoS One* 5:e10201; doi:10.1371/journal.pone.0010201.
- Carujo S, Estanyol JM, Ejarque A, Agell N, Bachs O, Pujol MJ (2006) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene* 25:4033–42; doi:10.1038/sj.onc.1209433.
- Chappie DJ, Burton GA (1997) Optimization of in situ bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:559–564; doi:10.1002/etc.5620160323.
- Che-Mendoza A, Penilla RP, Rodríguez DA (2009) Insecticide resistance and glutathione

- S-transferases in mosquitoes: A review. *African J. Biotechnol.* 8: 1386–97.
- Chen FW, Ioannou YA (1999) Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int. Rev. Immunol.* 18: 429–48.
- Choi J, Roche H (2004) Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarker of environmental monitoring. *Environ. Monit. Assess.* 92: 229–39.
- Clark AG, Shamaan NA, Sinclair MD, Dauterman WC (1986) Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferases in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 25:169–175; doi:10.1016/0048-3575(86)90044-1.
- Clark K, Cousins IT, Mackay D, Yamada K (2003) Observed Concentrations in the Environment. En *The Handbook of Environmental Chemistry Vol.3, Part Q*, pp. 125–177. Springer-Verlag, Berlin.
- Clever U, Karlson P (1960) [Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone]. *Exp. Cell Res.* 20: 623–6.
- Clewell RA, Campbell JL, Ross SM, Gaido KW, Clewell HJ, Andersen ME (2010) Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response. *Toxicol. In Vitro* 24:327–34; doi:10.1016/j.tiv.2009.08.003.
- Cobo F (1988) *Los Quironómidos (Diptera: Chironomidae) de los ríos Ulla y Sar. Estudio faunístico y ecológico. Tesis Doctoral.* Universidad de Santiago de Compostela.
- Cochrane BJ, LeBlanc GA (1986) Genetics of xenobiotic metabolism in *Drosophila*. I. Genetic and environmental factors affecting glutathione-S-transferase in larvae. *Biochem. Pharmacol.* 35: 1679–84.
- Conney AH (2003) Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:1–30; doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135754.
- Cortés E, Botella LM, Baretino D, Díez JL (1989) Identification of the spl products of Balbiani ring genes in *Chironomus thummi*. *Chromosoma* 98: 428–32.
- Corton JC, Lapinskas PJ (2005) Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol. Sci.* 83:4–17; doi:10.1093/toxsci/kfi011.
- Costa PM, Miguel C, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM y col. (2011) Transcriptomic analyses in a benthic fish exposed to contaminated estuarine sediments through laboratory and in situ bioassays. *Ecotoxicology* 20:1749–64; doi:10.1007/s10646-011-0708-z.
- CPSC (2010) *Overview of Phthalates Toxicity.* United States Consumer Product Safety Commission, Bethesda.
- Creaney J, Wijffels GL, Sexton JL, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC (1995) Fasciola hepatica: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 81: 106–16.
- Crocker JF, Safe SH, Acott P (1988) Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J. Toxicol. Environ. Health* 23:433–44; doi:10.1080/15287398809531126.
- Damásio J, Navarro-Ortega A, Tauler R, Lacorte S, Barceló D, Soares AMVM y col. (2010) Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution

- using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology* 19:1084–94; doi:10.1007/s10646-010-0490-3.
- Daneholt B (2001) Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:7012–7; doi:10.1073/pnas.111145498.
- Dang W, Hu Y, Zhang M, Sun L (2010) Identification and molecular analysis of a stress-inducible Hsp70 from *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29:600–7; doi:10.1016/j.fsi.2010.06.001.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000a) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in mice. *Toxicol. Sci.* 58:377–85; doi:10.1093/toxsci/58.2.377.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000b) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55:433–43; doi:10.1093/toxsci/55.2.433.
- David S, Bucchieri F, Corrao S, Czarnecka AM, Campanella C, Farina F y col. (2013) Hsp10: anatomic distribution, functions, and involvement in human disease. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 5: 768–78.
- Davies L, Williams DR, Turner PC, Rees HH (2006) Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P450, CYP18A1, in *Lepidoptera*. *Arch. Biochem. Biophys.* 453:4–12; doi:10.1016/j.abb.2006.06.016.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128:216–23; doi:10.1006/taap.1994.1200.
- de la Peña de Torres E, Herrero O (2005) Evaluación toxicológica de residuos orgánicos. *Rev. salud Ambient.* 5: 142–51.
- Deak P, Laufer H (1995) Ecdysteroid receptor in *Chironomus thummi* (Diptera: Chironomidae). *Eur. J. Entomol.* 92: 251–7.
- Deak P, Zavorszky P, Maroy P (1988) Moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 18:847–852; doi:10.1016/0020-1790(88)90109-6.
- Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD (2001) Stress proteins: a role in insect diapause? En *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality* (D.L. Denlinger, J.M. Giebutowitz, D.S. Saunders eds. ), pp. 155–171. Elsevier, Amsterdam.
- Díaz-Fierros F (2000) Procesos de contaminación difusa del agua en áreas urbanas y periurbanas de la cuenca del río Sar. Universidad de Santiago de Compostela.
- Díez JL, Vilariño VR, Medina FJ, Morcillo G (2006) Nucleolar localization of a reverse transcriptase related to telomere maintenance in *Chironomus* (Diptera). *Histochem. Cell Biol.* 126:445–52; doi:10.1007/s00418-006-0179-0.
- DIN (1991) DIN 38412-33: German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of green algae to the toxicity of waste water (*Scenedesmus chlorophyll fluorescence test*) by way of dilution series. Deutsches Institut für Normung.
- Domingues I, Guilhermino L, Soares AMVM, Nogueira AJA, Monaghan KA (2009) Influence of exposure scenario on pesticide toxicity in the midge *Kiefferulus calligaster* (Kieffer). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:450–7; doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.009.
- EC (2000) Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. European

Commission DG ENV, Delft.

ECB (2007) *European Union Risk Assessment Report - benzyl butyl phthalate (BBP)*. European Chemicals Bureau, Luxembourg.

ECB (2008) *European Union Risk Assessment Report - bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)*. European Chemicals Bureau, Luxembourg.

ECHA (2008a) *Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director)*. European Chemicals Agency, Helsinki.

ECHA (2008b) *Member State Committee Support Document for Identification fo bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as a Substance of Very High Concern*. European Chemicals Agency, Helsinki.

ECPI (1996) *Assessment of the release, occurrence and possible effects of plasticisers in the environment; Phthalate Esters Used in Plasticised PVC*. European Council for Plasticisers & Intermediates, Brussels.

EEC (1994) *EEC water quality objectives for chemicals dangerous to aquatic environment (List I)*. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 137: 83–110.

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J (2005) *Insect glutathione transferases and insecticide resistance*. Insect Mol. Biol. 14:3–8; doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.

Environment Canada (1997) *Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using the Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius)*. Environment Canada, Ottawa.

EPA (1996a) *Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1735 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Freshwater*. United States Environmental Protection Agency,

Washington.

EPA (1996b) *Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1790 Chironomid Sediment Toxicity Test*. United States Environmental Protection Agency, Washington.

EPA (2000) *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second Edition*. United States Environmental Protection Agency, Washington.

EPA (2003) *2003 Draft Update of Ambient Water Quality Criteria for Copper*. United States Environmental Protection Agency, Washington.

Escartín E, Porte C (1996) *Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish Procambarus clarkii exposed to fenitrothion*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 34:160–4; doi:10.1006/eesa.1996.0058.

EU (2001) *Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 21 de agosto de 2001, L225. Luxembourg.

EU (2004) *Directiva 2004/73/CE de la Comisión, de 29 de abril de 2004, por la que se adapta, por vigésima novena vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas*. Diario Oficial de la Unión Europea, 30 de abril de 2004, L152. Luxembourg.

EU (2006) *Reglamento (CE) nº 1907/2006 del*

- Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 29 de mayo de 2007, L136, Luxembourg.
- EU (2008) Reglamento (CE) n° 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n° 1907/2006. Diario Oficial de la Unión Europea, 31 de diciembre de 2008, L353. Luxembourg.
- EU (2011) Reglamento (UE) n° 544/2011 de la Comisión, de 10 de junio de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas. Diario Oficial de la Unión Europea, 11 de junio de 2011, L155, Luxembourg.
- EU (2012) Reglamento (UE) n° 528/2012, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. Diario Oficial de la Unión Europea, 27 de junio de 2012, L167, Luxembourg.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889–95.
- Fan L-Q, You L, Brown-Borg H, Brown S, Edwards RJ, Corton JC (2004) Regulation of phase I and phase II steroid metabolism enzymes by PPAR alpha activators. *Toxicology* 204:109–21; doi:10.1016/j.tox.2004.06.018.
- Faria MS, Lopes RJ, Malcato J, Nogueira AJA, Soares AMVM (2008) In situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to biomonitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. *Environ. Pollut.* 151:213–21; doi:10.1016/j.envpol.2007.01.050.
- FDA (2001) *Safety Assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices*. United States Food and Drug Administration, Rockville.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243–82; doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Feyereisen R (2006) Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.* 34:1252–5; doi:10.1042/BST0341252.
- Feyereisen R (1999) Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44:507–33; doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.
- Fisher TC, Crane M, Callaghan A (2000) An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:1749–1752; doi:10.1002/etc.5620190707.
- Fontana F (1781) *Traité sur le venin de la vipère, sur les poisons américains, sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons végétaux*. Florence.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 272–80.
- Forget-Leray J, Landriau I, Minier C, Leboulenger F (2005) Impact of endocrine toxicants on

- survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:288–94; doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.008.
- Fromme H, Küchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A (2002) Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36: 1429–38.
- Funabashi T, Kawaguchi M, Kimura F (2001) The endocrine disruptors butyl benzyl phthalate and bisphenol A increase the expression of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the preoptic area of adult ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 74:77–81; doi:54672.
- Gao L, Li Y, Pei X, Chen X (2003) Effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP) on mouse embryos development in vitro. *Wei Sheng Yan Jiu* 32: 198–200.
- Gébrane-Younès J, Sirri V, Junèra HR, Roussel P, Hernandez-Verdum D (2005) Nucleolus: an essential nuclear domain. En *Visions of the cell nucleus* (P. Hemmerich, S. Diekmann eds.), pp. 120–135. ASP, Valencia.
- Gehring U (1998) Steroid hormone receptors and heat shock proteins. *Vitam. Horm.* 54:167–205; doi:10.1016/S0083-6729(08)60925-5.
- Giesy JP, Rosiu CJ, Graney RL, Henry MG (1990) Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:233–248; doi:10.1002/etc.5620090214.
- Giguère V (2002) To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 220–5.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.* 47:883–916; doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145302.
- Gilbert LI, Warren JT (2005) A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. *Vitam. Horm.* 73:31–57; doi:10.1016/S0083-6729(05)73002-8.
- Gillesby BE, Zacharewski TR (1998) Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:3–14; doi:10.1002/etc.5620170102.
- Goff G Le, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, Sofer L y col. (2006) Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:674–82; doi:10.1016/j.ibmb.2006.05.009.
- Gorab E, Garcia de Lacoba M, Botella LM (1995) Structural constraints in expansion segments from a midge 26S rDNA. *J. Mol. Evol.* 41: 1016–21.
- Govinda S, Kutlow T, Bentivegna CS (2000) Identification of a putative ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius* and its response to cadmium, heat shock, and actinomycin D. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14: 195–203.
- Grant CM, Quinn KA, Dawes IW (1999) Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2650–6.
- Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W, Chambon P (1988) The N-terminal DNA-binding “zinc finger” of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* 7: 3037–44.
- Gronemeyer H (1992) Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J.* 6: 2524–9.



- Gronemeyer H, Meyer ME (1991) [Nuclear receptors. Hormones, anti-hormones and regulation of the transcription]. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 52: 335–8.
- Grossbach U (1977) The salivary gland of *Chironomus* (Diptera): A model system for the study of cell differentiation. En *Results and problems in cell differentiation* (W. Beermann ed. ), pp. 147–196. Springer-Verlag, Berlin.
- Grummt I (2010) Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS J.* 277:4626–39; doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07892.x.
- Gui Z, Hou C, Liu T, Qin G, Li M, Jin B (2009) Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *J. Econ. Entomol.* 102: 1591–8.
- Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy J-P, Pasricha S, Lumb C y col. (2011) CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Dev. Biol.* 349:35–45; doi:10.1016/j.ydbio.2010.09.023.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86:377–84; doi:10.1016/j.lfs.2009.12.015.
- Halpern M, Gasith A, Bresler VM, Broza M (2002) The protective nature of *Chironomus luridus* larval tubes against copper sulfate. *J. Insect Sci.* 2: 8.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y y col. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* 7:665–74; doi:10.1038/ncb1268.
- Harrahy EA, Clements WH (1997) Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:317–327; doi:10.1002/etc.5620160230.
- Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP y col. (2000) Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows ( *Pimephales promelas* ). *Environ. Sci. Technol.* 34:3003–3011; doi:10.1021/es991292a.
- Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105:802–11.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852–8; doi:10.1126/science.1068408.
- Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S y col. (2007) DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum. Reprod.* 22:688–95; doi:10.1093/humrep/del428.
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445–600; doi:10.3109/10409239509083491.
- Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KG, Ranson H (1998) The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353:1695–9; doi:10.1098/rstb.1998.0320.

- Henderson B (2010) Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem. Funct.* 28:1–14; doi:10.1002/cbf.1609.
- Henderson RF, Bechtold WE, Bond JA, Sun JD (1989) The use of biological markers in toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 20:65–82; doi:10.3109/10408448909017904.
- Hermoso de Mendoza M, Soler F, Pérez M (2008) Los mamíferos salvajes terrestres como bioindicadores: nuevos avances en Ecotoxicología. *Obs. Medioambient.* 11: 37–62.
- Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ (2012) Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat. Res.* 743:20–4; doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.028.
- Hill IR, Matthiessen P, Heimbach F (1993) *Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments : from the “Workshop on sediment toxicity assessment”, held at Slot Moermond Congrescentrum, Renesse, The Netherlands, 8 - 10 November 1993.* Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe, Renesse.
- Hoffman DJ, Rattne BA, Burton Jr. GA, Cairns Jr. J (1995) *Handbook of Ecotoxicology.* Lewis Publishers, Boca Raton.
- Hoke RA, Giesy JP, Zabik M, Unger M (1993) Toxicity of sediments and sediment pore waters from the Grand Calumet River-Indiana Harbor, Indiana area of concern. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26:86–112; doi:10.1006/eesa.1993.1042.
- Horn O, Nalli S, Cooper D, Nicell J (2004) Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38:3693–8; doi:10.1016/j.watres.2004.06.012.
- Hu X, Wen B, Zhang S, Shan X (2005) Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62:26–34; doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.012.
- Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 26:365–481; doi:10.3109/10408449609048302.
- Hudson LA, Ciborowski JJH (1996) Teratogenic and genotoxic responses of larval *Chironomus salinarius* group (diptera: Chironomidae) to contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1375–1381; doi:10.1002/etc.5620150817.
- IARC (2000) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 77 Some Industrial Chemicals.* International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- IPCS (1992) *Environmental Health Criteria 131. Diethylhexyl phthalate.* International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- ISO (1996a) *ISO 7346-2: Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 2: Semi-static method.* International Organization for Standardization.
- ISO (1996b) *ISO 7346-3: Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 3: Flow-through method.* International Organization for



- Standardization.
- ISO (2004) *ISO 8692: Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae*. International Organization for Standardization.
- Ito Y, Yokota H, Wang R, Yamanoshita O, Ichihara G, Wang H y col. (2005) Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch. Toxicol.* 79: 147–54; doi:10.1007/s00204-004-0615-7.
- Iwamuro S, Yamada M, Kato M, Kikuyama S (2006) Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sci.* 79: 2165–71; doi:10.1016/j.lfs.2006.07.013.
- Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 145–60; doi:10.1007/s10646-006-0110-4.
- Jemec A, Drobne D, Tisler T, Sepčić K (2010) Biochemical biomarkers in environmental studies--lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17: 571–81; doi:10.1007/s11356-009-0112-x.
- Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582–7.
- Kamijo Y, Hora K, Nakajima T, Kono K, Takahashi K, Ito Y y col. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against glomerulonephritis induced by long-term exposure to the plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 176–88; doi:10.1681/ASN.2006060597.
- Kang J-H, Asai D, Aasi D, Katayama Y (2007) Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 37: 607–25; doi:10.1080/10408440701493103.
- Karouna-Renier NK, Rao KR (2009) An inducible HSP70 gene from the midge *Chironomus dilutus*: characterization and transcription profile under environmental stress. *Insect Mol. Biol.* 18: 87–96; doi:10.1111/j.1365-2583.2008.00853.x.
- Kayser H, Winkler T, Spindler-Barth M (1997) 26-hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by a typical cytochrome P-450-dependent oxidase and related to ecdysteroid resistance in an insect cell line. *Eur. J. Biochem.* 248: 707–16.
- Kiesler E, Miralles F, Visa N (2002) HEL/UAP56 binds cotranscriptionally to the Balbiani ring pre-mRNA in an intron-independent manner and accompanies the BR mRNP to the nuclear pore. *Curr. Biol.* 12: 859–62.
- Kim E-J, Kim J-W, Lee S-K (2002) Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environ. Int.* 28: 359–65.
- Kim EJ, Lee SK (2004) Reduced viability of F1 egg ropes in *Chironomus riparius* exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *J. Environ. Biol.* 25: 259–61.
- Knox C, Luke GA, Blatch GL, Pesce E-R (2011) Heat shock protein 40 (Hsp40) plays a key role in the virus life cycle. *Virus Res.* 160: 15–24; doi:10.1016/j.virusres.2011.06.013.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int. J. Androl.*

- 29:155–65; discussion 181–5; doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x.
- Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67: 59–77.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM y col. (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5: 891–7.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941–51; doi:10.1016/0092-8674(87)90581-2.
- Kwak IS, Lee W (2005) Endpoint for DEHP exposure assessment in *Chironomus riparius*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74:1179–85; doi:10.1007/s00128-005-0705-0.
- Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16:109–30; doi:10.1007/s10646-006-0113-1.
- Lagadic L (2002) Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Rev. Med.Vet. (Toulouse).* 153: 581–588.
- Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3:193–208; doi:10.1007/BF00117084.
- Langer-Jaesrich M, Köhler H-R, Gerhardt A (2010) Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58:963–72; doi:10.1007/s00244-009-9420-x.
- Larsson P, Thurén A (1987) DI-2-ethylhexylphthalate inhibits the hatching of frog eggs and is bioaccumulated by tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 6:417–422; doi:10.1002/etc.5620060602.
- Laschet JJ, Minier F, Kurcewicz I, Bureau MH, Trottier S, Jeanneteau F y col. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J. Neurosci.* 24:7614–22; doi:10.1523/JNEUROSCI.0868-04.2004.
- Latini G, Felice C De, Presta G, Vecchio A Del, Paris I, Ruggieri F y col. (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111: 1783–5.
- Latini G, Vecchio A Del, Massaro M, Verrotti A, Felice C De (2006) Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 226:90–8; doi:10.1016/j.tox.2006.07.011.
- Laudet V (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19: 207–26.
- Lee S-M, Lee S-B, Park C-H, Choi J (2006) Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65:1074–81; doi:10.1016/j.chemosphere.2006.02.042.
- Leppänen MT, Ristola T, Johnson J, Burton GA (2006) Applying adult emergence as an endpoint in a post-exposure laboratory test using two midge species (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere* 64:1667–74; doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.031.
- Lertsirison R, Soda S, Sei K, Ike M (2009) Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural

- sunlight irradiation. *J. Environ. Sci. (China)* 21: 285–90.
- Lewis DFV, Ito Y (2008) Cytochrome P450 structure and function: an evolutionary perspective. En *Cytochromes P450. Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics. Issues in Toxicology* (C. Ioannides ed.) RSC Publishing, Cambridge.
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1151–91; doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631–77; doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.
- Liu D, Kottke I (2004) Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *J. Biosci.* 29: 329–35.
- Liu T, Daniels CK, Cao S (2012) Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* 136:354–74; doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.014.
- Liu Y, Guan Y, Yang Z, Cai Z, Mizuno T, Tsuno H y col. (2009) Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18:293–303; doi:10.1007/s10646-008-0283-0.
- Londoño DK, Siegfried BD, Lydy MJ (2004) Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere* 56:701–6; doi:10.1016/j.chemosphere.2003.12.001.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111: 139–45.
- Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E y col. (2009) Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 12:225–49; doi:10.1080/10937400903094091.
- MacDonald MM, Warne AL, Stock NL, Mabury S a, Solomon KR, Sibley PK (2004) Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid to *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2116–23.
- Madrigal-Matute J, López-Franco Ó, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Ramos-Mozo P, Oostrom M van y col. (2009) Las proteínas de choque térmico (heat shock proteins) como potenciales dianas terapéuticas en aterosclerosis. *Clin. Investig. Arterioscler.* 21: 163–172.
- Magdoui S, Daghrir R, Brar SK, Drogui P, Tyagi RD (2013) Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *J. Environ. Manage.* 127:36–49; doi:10.1016/j.jenvman.2013.04.013.
- Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Carlo V Di, Stefanini S (2003) Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem. Cell Biol.* 120:41–9; doi:10.1007/s00418-003-0543-2.
- Majumdar TN, Gupta A (2012) Acute and chronic toxicity of copper on aquatic insect *Chironomus ramosus* from Assam, India. *J. Environ. Biol.* 33: 139–42.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841–50.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K y col. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–9.

- Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP (2013) Biological impact of phthalates. *Toxicol. Lett.* 217:50–8; doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.025.
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir MK, Warholm M y col. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 7202–6.
- Mansur NR, Meyer-Siegler K, Wurzer JC, Sirover MA (1993) Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Res.* 21: 993–8.
- Marcano L, Carruyo I, Campo A Del, Montiel X (2002) Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. *Environ. Res.* 88:30–5; doi:10.1006/enrs.2001.4316.
- Martinez EA, Moore BC, Schaumlöffel J, Dasgupta N (2002) The potential association between mental deformities and trace elements in Chironomidae (Diptera) taken from a heavy metal contaminated river. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:286–91; doi:10.1007/s00244-001-0190-0.
- Martinez JL, Edström JE, Morcillo G, Diez JL (2001a) Telomeres in *Chironomus thummi* are characterized by different subfamilies of complex DNA repeats. *Chromosoma* 110: 221–7.
- Martinez JL, Sanchez-Elsner T, Morcillo G, Diez JL (2001b) Heat shock regulatory elements are present in telomeric repeats of *Chironomus thummi*. *Nucleic Acids Res.* 29: 4760–6.
- Martínez-Guitarte JL, Planelló R, Morcillo G (2007) Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 147:590–6; doi:10.1016/j.cbpb.2007.03.015.
- Martínez-Guitarte J-L, Planelló R, Morcillo G (2012) Overexpression of long non-coding RNAs following exposure to xenobiotics in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 110-111:84–90; doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.013.
- Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2012) Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 155:333–43; doi:10.1016/j.cbpc.2011.10.001.
- Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50:37–49; doi:10.1016/j.yrtph.2007.09.004.
- Maul JD, Brennan AA, Harwood AD, Lydy MJ (2008) Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil, and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization, and survival. *Environ. Toxicol. Chem.* 27:2582–90; doi:10.1897/08-185.1.
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:670–84; doi:10.1007/s00018-004-4464-6.
- McCarthy J, Shugart L (1990) Biological markers of environmental contamination. En *Biomarkers of Environmental Contamination* (J.

- McCarthy, L. Shugart eds. ), pp. 3–14. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Melville MW, Hansen WJ, Freeman BC, Welch WJ, Katze MG (1997) The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of P58IPK, the cellular inhibitor of PKR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 97–102.
- Meregalli G, Bettinetti R, Pluymers L, Vermeulen AC, Rossaro B, Ollevier F (2002) Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:405–9; doi:10.1007/s00244-001-0040-3.
- Meregalli G, Vermeulen AC, Ollevier F (2000) The use of chironomid deformation in an in situ test for sediment toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47:231–8; doi:10.1006/eesa.2000.1981.
- Metcalf CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ y col. (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 297–308.
- Michailova P, Ilkova J, White KN (2003) Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminium. *Environ. Pollut.* 123: 193–207.
- Michailova P, Petrova N, Ilkova J, Bovero S, Brunetti S, White K y col. (2006) Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Environ. Pollut.* 144:647–54; doi:10.1016/j.envpol.2005.12.041.
- Ming J, Xie J, Xu P, Liu W, Ge X, Liu B y col. (2010) Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunol.* 28:407–18; doi:10.1016/j.fsi.2009.11.018.
- Moore RV, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 109: 229–37.
- Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL y col. (2011) Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 153:150–8; doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.003.
- Morcillo G, Díez JL, Botella LM (1994) Heat shock activation of telomeric sequences in different tissues of *Chironomus thummi*. *Exp. Cell Res.* 211:163–7; doi:10.1006/excr.1994.1072.
- Morcillo G, Díez JL, Carbajal ME, Tanguay RM (1993) HSP90 associates with specific heat shock puffs (hsr omega) in polytene chromosomes of *Drosophila* and *Chironomus*. *Chromosoma* 102:648–59; doi:10.1007/BF00352313.
- Morcillo G, Gorab E, Tanguay RM, Díez JL (1997) Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in polytene cells. *Exp. Cell Res.* 236:361–70; doi:10.1006/excr.1997.3726.
- Moreno MD (2003) Evaluación de riesgo para la salud humana. En *Toxicología Ambiental* McGraw-Hill, Madrid.
- Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K (1992) Transcriptional regulation of heat shock

- genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* 267: 21987–90.
- Motoyama N, Dauterman WC (1977) Purification and properties of housefly glutathione. *Insect Biochem.* 7:361–369; doi:10.1016/0020-1790(77)90039-7.
- Mu X, Rider C V, Hwang GS, Hoy H, LeBlanc GA (2005) Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 146–52.
- Nair PMG, Choi J (2011a) Characterization of a ribosomal protein L15 cDNA from *Chironomus riparius* (Diptera; Chironomidae): transcriptional regulation by cadmium and silver nanoparticles. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 159:157–62; doi:10.1016/j.cbpb.2011.03.006.
- Nair PMG, Choi J (2011b) Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquat. Toxicol.* 101:550–60; doi:10.1016/j.aquatox.2010.12.006.
- Nair PMG, Choi J (2012) Modulation in the mRNA expression of ecdysone receptor gene in aquatic midge, *Chironomus riparius* upon exposure to nonylphenol and silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33:98–106; doi:10.1016/j.etap.2011.09.006.
- Nair PMG, Park SY, Choi J (2012) Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 163:37–42; doi:10.1016/j.cbpb.2012.04.004.
- Nair PMG, Park SY, Lee S-W, Choi J (2011) Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 101:31–7; doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.013.
- Naito W, Gamo Y, Yoshida K (2006) Screening-level risk assessment of Di(2-ethylhexyl) phthalate for aquatic organisms using monitoring data in Japan. *Environ. Monit. Assess.* 115:451–71; doi:10.1007/s10661-006-7239-8.
- National Research Council (1987) Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ. Health Perspect.* 74:3–9; doi:10.2307/3430428.
- NICNAS (2010) *Diethylhexyl Phthalate*. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, Sydney.
- Norman A, Börjeson H, David F, Tienpont B, Norrgren L (2007) Studies of uptake, elimination, and late effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) dietary exposed to Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Environ. Int.* 52:235–42; doi:10.1007/s00244-005-5089-y.
- NTP-CERHR (2003) *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP)*. National Institutes of Health, Bethesda.
- NTP-CERHR (2006) *NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. National Institutes of Health, Bethesda.
- OECD (1992) *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.



- OECD (2004a) *Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2004b) *Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2007) *Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2010) *Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2011a) *40 Years of Chemical Safety at the OECD: Quality and Efficiency*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2011b) *Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2011c) *Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Oehlmann J, Oetken M, Schulte-Oehlmann U (2008) A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environ. Res.* 108:140–9; doi:10.1016/j.envres.2008.07.016.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 75:2207–2218; doi:10.1351/pac200375112207.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytch O, Lutz I, Kusk KO y col. (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:2047–62; doi:10.1098/rstb.2008.0242.
- Olson MOJ (2004) Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE* 2004:pe10; doi:10.1126/stke.2242004pe10.
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP (2002) Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers* 7:33–48; doi:10.1080/13547500110066119.
- Ostrander GK (2005) *Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Panti C, Spinsanti G, Marsili L, Casini S, Frati F, Fossi MC (2011) Ecotoxicological diagnosis of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean basin by skin biopsy and gene expression approach. *Ecotoxicology* 20:1791–800; doi:10.1007/s10646-011-0713-2.
- Park K, Kwak I-S (2008a) Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74:89–95; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.041.
- Park K, Kwak I-S (2008b) Expression of *Chironomus riparius* serine-type endopeptidase gene under di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) exposure. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 151:349–54;

doi:10.1016/j.cbpb.2008.08.004.

Park K, Kwak I-S (2009a) Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150:361–7; doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.015.

Park K, Kwak I-S (2009b) Calponin gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Toxicol.* 24:555–62; doi:10.1002/tox.20463.

Park K, Kwak I-S (2010) Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79:934–41; doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.

Park K, Kwak I-S (2012) Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 156:113–20; doi:10.1016/j.cbpc.2012.05.002.

Park K, Park J, Kim J, Kwak I-S (2010) Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151:439–46; doi:10.1016/j.cbpc.2010.01.009.

Parks LG, Ostby JS, Lambricht CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ y col. (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58:339–49; doi:10.1093/toxsci/58.2.339.

Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437–96;

doi:10.1146/annurev.ge.27.120193.002253.

Patterson RL, Rossum DB van, Kaplin AI, Barrow RK, Snyder SH (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca<sup>2+</sup> release via locally derived NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:1357–9; doi:10.1073/pnas.0409657102.

Paumen ML, Borgman E, Kraak MHS, Gestel CAM van, Admiraal W (2008) Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. *Environ. Pollut.* 152:225–32; doi:10.1016/j.envpol.2007.04.027.

Pellinen J, Soimasuo R (1993) Toxicity of sediments polluted by the pulp and paper industry to a midge (*Chironomus riparius* Meigen). *Sci. Total Environ.* 134:1247–1256; doi:10.1016/S0048-9697(05)80130-5.

Peterson JSK, Bain LJ (2004) Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 66:345–55; doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.005.

Piña B, Casado M, Quirós L (2007) Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trends Analyt. Chem.* 26:1145–1154; doi:10.1016/j.trac.2007.09.009.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2007) Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373:113–21; doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.038.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2008) The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71:1870–6; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.033.



- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2010) Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 408:1598–603; doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.004.
- Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011) Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquat. Toxicol.* 105:62–70; doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.011.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC y col. (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 143:303–15; doi:10.1016/j.cbpc.2006.03.004.
- Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Cavigliolo G, Chan S, Holman PS y col. (2007) *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1044–50.
- Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 228: 111–33.
- Qin W, Tyshenko MG, Wu BS, Walker VK, Robertson RM (2003) Cloning and characterization of a member of the Hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperones* 8: 144–52.
- Rajaiya J, Yousuf MA, Singh G, Stanish H, Chodosh J (2012) Heat shock protein 27 mediated signaling in viral infection. *Biochemistry* 51:5695–702; doi:10.1021/bi3007127.
- Rakotondravelo ML, Anderson TD, Charlton RE, Zhu KY (2006) Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (diptera: chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51:360–6; doi:10.1007/s00244-005-0227-0.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV y col. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298:179–81; doi:10.1126/science.1076781.
- Ranson H, Hemingway J (2005a) Glutathione Transferases. En *Comprehensive Molecular Insect Science. Volume 5: Pharmacology* (L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill eds.) Vol. null of, pp. 383–402. Elsevier, Amsterdam.
- Ranson H, Hemingway J (2005b) Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:226–41; doi:10.1016/S0076-6879(05)01014-1.
- Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW y col. (2001) Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359: 295–304.
- Repetto M, Repetto G (2009) *Toxicología Fundamental. Cuarta Edición*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
- Rhee J-S, Raisuddin S, Lee K-W, Seo JS, Ki J-S, Kim I-C y col. (2009) Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149:104–12; doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.009.

- Richter CA, Taylor JA, Ruhlen RL, Welshons W V, Saal FS Vom (2007) Estradiol and Bisphenol A stimulate androgen receptor and estrogen receptor gene expression in fetal mouse prostate mesenchyme cells. *Environ. Health Perspect.* 115:902–8; doi:10.1289/ehp.9804.
- Riddiford LM (1978) Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34: 438–46.
- Riddiford LM (1993) Hormones and *Drosophila* development. En *The development of Drosophila melanogaster* (N. Bate, A. Martínez-Arias eds. ), pp. 899–939. Cold Spring Harbor, New York.
- Rieradevall M, García-Berthou E (1995) Chironomids in the diet of fish in Lake Banyoles (Catalonia, Spain). En *Chironomids: from genes to ecosystems* (P.S. Cranston ed. ), pp. 335–340. CSIRO Publications.
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia* 18:571–573; doi:10.1007/BF02172188.
- Rodríguez EM, Medesani DA, Fingerman M (2007) Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146:661–71; doi:10.1016/j.cbpa.2006.04.030.
- Roh J-Y, Jung I-H, Lee J-Y, Choi J (2007) Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 237:126–33; doi:10.1016/j.tox.2007.05.008.
- Rotchell JM, Ostrander GK (2003) Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 6:453–96; doi:10.1080/10937400306476.
- Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.* 78:1187–94; doi:10.1016/S0015-0282(02)04389-3.
- Rudkin GT, Stollar BD (1977) High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265: 472–3.
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen Publishing Ltd., London.
- Ryan MT, Naylor DJ, Høj PB, Clark MS, Hoogenraad NJ (1997) The role of molecular chaperones in mitochondrial protein import and folding. *Int. Rev. Cytol.* 174:127–93; doi:10.1016/S0074-7696(08)62117-8.
- Rydlander L, Edström J-E (1980) Large sized nascent protein as dominating component during protein synthesis in *Chironomus salivary glands*. *Chromosoma* 81:85–99; doi:10.1007/BF00292424.
- Ryzlak MT, Pietruszko R (1988) Heterogeneity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 954: 309–24.
- Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki A, Yamada T, Inoue K, Momoi T, Tokunaga H, Sakiyama K y col. (2011) Localization of heat shock protein 27 (hsp27) in the rat gingiva and its changes with tooth eruption. *Acta Histochem. Cytochem.* 44:17–24; doi:10.1267/ahc.10033.

- Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 11669–74.
- Schlecht R, Erbse AH, Bukau B, Mayer MP (2011) Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:345–51; doi:10.1038/nsmb.2006.
- Schmid P, Schlatter C (1985) Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica.* 15:251–6; doi:10.3109/00498258509045356.
- Scholz S, Mayer I (2008) Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293:57–70; doi:10.1016/j.mce.2008.06.008.
- Scholz S, Renner P, Belanger SE, Busquet F, Davi R, Demeneix BA y col. (2013) Alternatives to in vivo tests to detect endocrine disrupting chemicals (EDCs) in fish and amphibians—screening for estrogen, androgen and thyroid hormone disruption. *Crit. Rev. Toxicol.* 43:45–72; doi:10.3109/10408444.2012.737762.
- Schwarzenberger A, Courts C, Elert E von (2009) Target gene approaches: Gene expression in *Daphnia magna* exposed to predator-borne kairomones or to microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics* 10:527; doi:10.1186/1471-2164-10-527.
- Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 757–77.
- Scott JG (2008) Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification. En *Recent Advances in Insect Physiology, Toxicology and Molecular Biology* (N. Liu ed. ), pp. 117–124. Research Signpost, Kerala.
- Scott JG, Wen Z (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* 57:958–67; doi:10.1002/ps.354.
- Sekimoto T, Iwami M, Sakurai S (2006) Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 15:281–92; doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00641.x.
- Servia MJ, Cobo F, González MA (2004) Multiple-trait analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: a case study using *Chironomus riparius* Meigen, 1804 larvae. *Environ. Monit. Assess.* 90: 101–12.
- Servia MJ, Péry ARR, Heydorff M, Garric J, Lagadic L (2006) Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15:229–40; doi:10.1007/s10646-005-0054-0.
- Sharpe RM (2001) Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol. Lett.* 120:221–32; doi:10.1016/S0378-4274(01)00298-3.
- Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328:447–51; doi:10.1136/bmj.328.7437.447.
- Shaw JR, Colbourne JK, Davey JC, Glaholt SP, Hampton TH, Chen CY y col. (2007) Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics* 8:477; doi:10.1186/1471-2164-8-477.

- Shen Y, Li Y, Ye F, Wang F, Lu W, Xie X (2010) Identification of suitable reference genes for measurement of gene expression in human cervical tissues. *Anal. Biochem.* 405:224–9; doi:10.1016/j.ab.2010.06.029.
- Silflow CD, Sun X, Haas NA, Foley JW, Lefebvre PA (2011) The Hsp70 and Hsp40 chaperones influence microtubule stability in *Chlamydomonas*. *Genetics* 189:1249–60; doi:10.1534/genetics.111.133587.
- Simoncelli F, Morosi L, Rosa I Di, Pascolini R, Fagotti A (2010) Molecular characterization and expression of a heat-shock cognate 70 (Hsc70) and a heat-shock protein 70 (Hsp70) cDNAs in *Rana* (Pelophylax) lessonae embryos. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 156:552–60; doi:10.1016/j.cbpa.2010.04.016.
- Sinha AK, Vanparys C, Boeck G De, Kestemont P, Wang N, Nguyen PT y col. (2010) Expression characteristics of potential biomarker genes in *Tra* catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, exposed to trichlorfon. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics* 5:207–16; doi:10.1016/j.cbd.2010.05.001.
- Sirakov M, Borra M, Cambuli FM, Plateroti M (2013) Defining suitable reference genes for RT-qPCR analysis on intestinal epithelial cells. *Mol. Biotechnol.* 54:930–8; doi:10.1007/s12033-012-9643-3.
- Sirover MA (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell. Biochem.* 66: 133–40.
- Snell TW, Brogdon SE, Morgan MB (2003) Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 12: 475–83.
- Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* 158:327–39; doi:10.1677/joe.0.1580327.
- Soin T, Smagghe G (2007) Endocrine disruption in aquatic insects: a review. *Ecotoxicology* 16:83–93; doi:10.1007/s10646-006-0118-9.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl : 113–22.
- Spahn SA, Sherry TW (1999) Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 377–84.
- Staples C, Peterson D, Parkerton T, Adams WJ (1997) The Environmental Fate of Phthalate Esters: A Literature Review. *Chemosphere* 35: 667–749.
- Steinberg CEW, Stürzenbaum SR, Menzel R (2008) Genes and environment - striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci. Total Environ.* 400:142–61; doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.023.
- Straalen NM Van (2003) Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.* 37: 324A–330A.
- Stuijzand SC, Drenth A, Helms M, Kraak MH (1998) Bioassays using the midge *Chironomus riparius* and the zebra mussel *Dreissena polymorpha* for evaluation of river water quality. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34:357–63; doi:10.1007/s002449900330.
- Summers DW, Wolfe KJ, Ren HY, Cyr DM (2013)

- The Type II Hsp40 SisI cooperates with Hsp70 and the E3 ligase Ubr1 to promote degradation of terminally misfolded cytosolic protein. *PLoS One* 8:e52099; doi:10.1371/journal.pone.0052099.
- Sundararaj KP, Wood RE, Ponnusamy S, Salas AM, Szulc Z, Bielawska A y col. (2004) Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279:6152–62; doi:10.1074/jbc.M310549200.
- Sung H-H, Kao W-Y, Su Y-J (2003) Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquat. Toxicol.* 64:25–37; doi:10.1016/S0166-445X(03)00011-0.
- Syms AJ, Norris JS, Panko WB, Smith RG (1985) Mechanism of androgen-receptor augmentation. Analysis of receptor synthesis and degradation by the density-shift technique. *J. Biol. Chem.* 260: 455–61.
- Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73: 1323–37.
- Tarze A, Deniaud A, Bras M Le, Maillier E, Molle D, Larochette N y col. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26:2606–20; doi:10.1038/sj.onc.1210074.
- Terriere LC (1984) Induction of detoxication enzymes in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 29:71–88; doi:10.1146/annurev.en.29.010184.000443.
- Thibaut R, Porte C (2004) Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92:485–94; doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.008.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–82.
- Tisdale EJ, Artalejo CR (2007) A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated events. *Traffic* 8:733–41; doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00569.x.
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389–98; doi:10.1016/0022-2836(74)90447-1.
- Tjalkens RB, Valerio LG, Awasthi YC, Petersen DR (1998) Association of glutathione S-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151:174–81; doi:10.1006/taap.1998.8430.
- Tucker KA, Burton GA (1999) Assessment of nonpoint-source runoff in a stream using in situ and laboratory approaches. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2797–2803; doi:10.1002/etc.5620181221.
- UNEP (2012) *Global Chemicals Outlook: Towards Sound Management of Chemicals*. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Uren-Webster TM, Lewis C, Filby AL, Paull GC, Santos EM (2010) Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99:360–9; doi:10.1016/j.aquatox.2010.05.015.

- Usui K, Fukami J, Shishido T (1977) Insect glutathione S-transferase: Separation of transferases from fat bodies of American cockroaches active on organophosphorus triesters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7:249–260; doi:10.1016/0048-3575(77)90016-5.
- Vo TTB, Jung E-M, Dang VH, Yoo Y-M, Choi K-C, Yu FH y col. (2009) Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:104; doi:10.1186/1477-7827-7-104.
- Voss C, Zerban H, Bannasch P, Berger MR (2005) Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 206:359–71; doi:10.1016/j.tox.2004.07.016.
- Waagner D, Heckmann L-H, Malmendal A, Nielsen NC, Holmstrup M, Bayley M (2010) Hsp70 expression and metabolite composition in response to short-term thermal changes in *Folsomia candida* (Collembola). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 157:177–83; doi:10.1016/j.cbpa.2010.06.171.
- Wang G-P, Xu C-S (2010) Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Mol. Biotechnol.* 46:49–57; doi:10.1007/s12033-010-9274-5.
- Wang H, Dong S-Z, Li K, Hu C, Ye G (2008) A heat shock cognate 70 gene in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*, and its expression in relation to thermal stress. *BMB Rep.* 41: 388–93.
- Wang J-X, Xi Y-L, Hu K, Liu X-B (2011) Effect of butyl benzyl phthalate on life table-demography of two successive generations of cladoceran *Moina macrocopa* Straus. *J. Environ. Biol.* 32: 17–22.
- Watanabe KH, Jensen KM, Orlando EF, Ankley GT (2007) What is normal? A characterization of the values and variability in reproductive endpoints of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146:348–56; doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.015.
- Watling L (1991) The Sedimentary Milieu and its Consequences for Resident Organisms. *Integr. Comp. Biol.* 31:789–796; doi:10.1093/icb/31.6.789.
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2001) Chronic exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55: 113–24.
- Weber RE, Braunitzer G, Kleinschmidt T (1985) Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VIIb, CTT IX and CTT X. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 80: 747–53.
- Weltje L, Schulte-Oehlmann U (2007) The seven year itch—progress in research on endocrine disruption in aquatic invertebrates since 1999. *Ecotoxicology* 16:1–3; doi:10.1007/s10646-006-0116-y.
- Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5:761–72; doi:10.1038/nrc1716.
- WHO (2013) *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. World Health Organization, Geneva.
- Wibe AE, Billing A, Rosenqvist G, Jenssen BM (2002) Butyl benzyl phthalate affects shoaling behavior and bottom-dwelling



- behavior in threespine stickleback. *Environ. Res.* 89:180–7; doi:10.1006/enrs.2002.4360.
- Wibe AE, Fjeld E, Rosenqvist G, Jenssen BM (2004) Postexposure effects of DDE and butylbenzylphthalate on feeding behavior in threespine stickleback. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57:213–9; doi:10.1016/S0147-6513(03)00005-8.
- Woodward KN (1990) Phthalate esters, cystic kidney disease in animals and possible effects on human health: a review. *Hum. Exp. Toxicol.* 9: 397–401.
- Wülker W, Götz P (1968) Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomus-larven (Dipt.). *Zeitschrift für Morphol. der Tiere* 62:363–388; doi:10.1007/BF00401562.
- Yang J, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, French-Constant RH y col. (2007) A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics* 30:223–31; doi:10.1152/physiolgenomics.00018.2007.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M y col. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366:476–9; doi:10.1038/366476a0.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71: 63–72.
- Yuen WK, Ho JW (2001) Purification and characterization of multiple glutathione S-transferase isozymes from Chironomidae larvae. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129: 631–40.
- Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46:282–93; doi:10.1006/toxs.1998.2505.
- Zala D, Hinckelmann M-V, Yu H, Lyra da Cunha MM, Liot G, Cordelières FP y col. (2013) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* 152:479–91; doi:10.1016/j.cell.2012.12.029.
- Zhang Q, Denlinger DL (2010) Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *J. Insect Physiol.* 56:138–50; doi:10.1016/j.jinsphys.2009.09.013.
- Zhang Y-H, Zheng L-X, Chen B-H (2006) Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai: a cross-sectional study. *Biomed. Environ. Sci.* 19: 205–9.
- Zheng L, Roeder RG, Luo Y (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114: 255–66.
- Zou E, Fingerman M (1997) Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38:281–5; doi:10.1006/eesa.1997.1589.
- Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan LY, Jan YN (2000) Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:13726–31; doi:10.1073/pnas.260496697.





# ANEXO I



Compuestos	Agua	Sed.	Compuestos	Agua	Sed.
<b>Alquilfenoles</b>	<b>(ng l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fragancias</b>	<b>(ng l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(ng g<sup>-1</sup>)</b>
Bisfenol A (BPA)	82,28	18,84	Galaxolide	3074	7,90
Nonilfenol (NP)	53,67	0,77	Tonalide	80,1	7,57
<b>Productos farmacéuticos</b>	<b>(ng l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pesticidas organoclorados</b>	<b>(ng l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(ng g<sup>-1</sup>)</b>
Ibuprofen	2025	25,62	a-HCH	9,68	0,13
Diclofenac	22,80	0,85	b-HCH	16,17	< 0,10
Carbamazepine	7,45	< 0,10	g-HCH	19,79	0,12
Atenolol	197	18,07	d-HCH	18,17	< 0,10
Cafeína	14365	0,94	Heptachlor	< 3,00	0,26
Flumequina	5,20		Aldrin	< 3,00	0,2
Amoxiciclina	5,64		Heptachlor epoxide	< 3,00	< 0,10
Enrofloxacin	< 5,00	< 0,10	g-Chlordane	< 3,00	0,1
<b>Metales pesados</b>	<b>(µg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(µg g<sup>-1</sup>)</b>	a-Chlordane	< 3,00	< 0,10
Cd	<0,01	< 0,10	a-Endosulfan	5,01	0,72
Pb	<0,5	11,52	p,p'-DDE	11,12	0,3
Cr	1,67	19,83	Dieldrin	9,81	< 0,10
Ni	2,82	10,50	Endrin	< 3,00	0,64
Cu	2,1	20,37	b-Endosulfan	14,96	19,28
As	1,97	2,35	p,p'-DDD	9,06	0,27
Hg	<0,05	0,05	Endrin aldehyde	3,31	3,29
Mn	60,29	96,31	Endosulfan sulfate	< 3,00	0,62
Zn	14,47	84,86	p,p'-DDT	14,8	1,93
	<b>(µg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(mg g<sup>-1</sup>)</b>	Endrin ketone	22,04	0,92
Al	17,51	8,34	Methoxychlor	< 3,00	1,99
Fe	57,35	9,19			

TABLA 16. Análisis cuantitativo de distintos compuestos presentes en las muestras de agua y sedimento del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo.

Plaguicidas	Agua	Sed.	Plaguicidas	Agua	Sed.
Avermectin B1a			Iprodione		
Acephate	+		Isoproturon	+	+
Acetamiprid	+	+	Linuron	+	
Azoxystorbin			Metamidophos		
Benalaxyl			Methiocarb	+	+
Benomyl	+	+	Methiocarb-sulfoxide		
Carbendazim	+		Methiocarb-sulfone		
Chloridazon			Methoxyfenozide		
Chlorotoluron	+	+	Omethoate		
Chlorpropham			Oxamyl		
Chlorpyrifos	+	+	Phosmet		
Clothianidin			Phosmetoxon		
Cyprodinil			Pirimicarb	+	+
Dimethoate			Pirimiphos-ethyl	+	+
Dimethomorph			Pirimiphos-methyl	+	+
Fenamiphos	+	+	Procymidone		
Fenamiphos-sulfoxide			Propamocarb		
Fenamiphos-sulfone			Pyrimethalin		
Fenarimol			Quinoxifen		
Fenhexamid			Spinosyn A		
Fipronil			Spinosyn D		
Fipronil-sulfide			Spiroxamine		
Fipronil-sulfone			Thiabendazole		
Flazasulfuron			Thiacloprid	+	
Fluroxypyr	+	+	Thiamethoxam		
Imazalil	+	+	Trifloxystrobin		
Indoxacarb					

TABLA 17. Análisis cualitativo de plaguicidas en las muestras de agua (ng l<sup>-1</sup>) y sedimento (ng g<sup>-1</sup>) del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo.

Compuestos	Agua	Sed.	Compuestos	Agua	Sed.
<b>Estrógenos</b>			<b>P. Farmacéuticos</b>		
17- $\alpha$ -Ethinylestradiol	+		Naproxen		
Estrone (E1)			Ketoprofen	+	+
17- $\beta$ -Estradiol (E2)			Salicylic acid	+	+
Estriol (E3)			Clofibric acid		
<b>Bactericidas</b>			Benzaifibrate		
Triclosan (TCS)			Fenoprofen	+	+
Triclocarban (TCC)			Indomethacine		
Methyl paraben	+	+	Propanolol		
Ethyl paraben	+	+	Salbutamol	+	
n-Propylparaben	+	+	Phenazone		
n-Butylparaben	+	+	Propyphenazone		
Benzylparaben	+	+	<b>Filtros solares</b>		
<b>Pesticidas organoclorados</b>			4-methylbenzylidene camphor	+	+
chlorpyriphos-methyl	+	+			
dicofol	+	+			
hexachlorobenzene	+	+			

TABLA 18. Análisis cualitativo de distintos compuestos en las muestras de agua ( $\text{ng l}^{-1}$ ) y sedimento ( $\text{ng g}^{-1}$ ) del río Sar recogidas en la zona de muestreo seleccionada para este trabajo.



# ANEXO II





Algunos de los resultados presentados en este trabajo han sido publicados en los últimos años en los siguientes artículos científicos:

- Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, **Herrero O**, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP* 153:150–8; doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.003.
- Planelló R, **Herrero O**, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2011. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 105:62–70; doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.011.
- Planelló R, Servia MJ, Gómez-Sande P, **Herrero O**, Cobo F, Morcillo G. 2013. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environmental toxicology*; doi:10.1002/tox.21893. (En prensa)





Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)

## Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress

Mónica Morales<sup>1</sup>, Rosario Planelló<sup>1</sup>, Pedro Martínez-Paz, Oscar Herrero, Estrella Cortés, José Luis Martínez-Guitarte, Gloria Morcillo<sup>\*</sup>

Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 August 2010

Received in revised form 8 October 2010

Accepted 10 October 2010

Available online 18 October 2010

## Keywords:

Hsp70

Hsc70

Cadmium

Butyl benzyl phthalate (BBP)

Diethylhexyl phthalate (DEHP)

Bisphenol A (BPA)

Pentachlorophenol (PCP)

4-Nonylphenol (NP)

Tributyltin oxide (TBTO)

Ethinylestradiol (EE)

## ABSTRACT

We characterized the Hsp70 cDNA in *Chironomus riparius* and evaluated its expression profile under different environmental stressors. It is highly conserved, at both DNA and protein levels, displaying many of the hallmarks of Hsps and sharing 80–96% of overall amino acid identities with homologous sequences from other diptera. The changes are mainly concentrated in the C-terminal domain of the protein. Phylogenetic analysis was consistent with the known classification of insects. The Hsp70 gene was located by in situ hybridization in region III-3A at the third polytene chromosome, a locus activated upon heat shock as shown by RNA pol II binding. As *C. riparius* is widely used in aquatic ecotoxicology testing, we studied Hsp70 gene induction in fourth instar aquatic larvae submitted to heat shock and selected environmental pollutants classified as potential endocrine disruptors. RT-PCR analysis showed that Hsp70 mRNA levels increased significantly ( $p < 0.05$ ) after short-term acute exposures to a temperature shift (HS), cadmium chloride (Cd), butyl benzyl phthalate (BBP), diethylhexyl phthalate (DEHP), bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (NP) and ethinylestradiol (EE). However, neither pentachlorophenol (PCP) nor tributyltin (TBTO) treatments were able to activate the Hsp70 gene. The cognate form, Hsc70, was also analysed and, unlike Hsp70, was not altered by any of the different treatments assayed. Moreover, at the times tested, there was no significant mortality of the larvae. The rapid upregulation of the Hsp70 gene suggests that it is sensitive and selective for different environmental pollutants, and could be used as an early molecular endpoint in ecotoxicological studies.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Several thousand anthropogenic chemicals are continuously released into the natural environment, and all organisms are challenged by events that cause acute or chronic stress. Gene–environment interactions play a critical role in these processes. Environmental toxicants can trigger biological effects at the organism level only after initiating biochemical and cellular events. The cellular response to stress is characterized by the activation of genes involved in cell survival to counteract the physiological disturbance induced by physical or chemical agents. Cells activate a set of genes, called heat-shock genes as they were discovered by temperature insults, which mediate protective responses to temperature, radiation and environmental contaminants (Morimoto, 1998). It is widely accepted that the family of heat-shock proteins counteracts cellular stress and its associated damage (Feder and Hoffman, 1999; Nolen and Morimoto, 2002). Hsps

are suitable as an early warning bioindicator of environmental hazard, because of their sensitivity to even minor changes in cellular homeostasis and their conservation along the evolutionary scale. Currently, their potential use for predicting the toxicity of chemicals is being actively investigated (De Pomerai, 1996; Gupta et al., 2010). Attention is also now being focused on modulating the expression of this group of proteins for the treatment of a wide variety of human diseases (Powers and Workman, 2007).

Among Hsps, the Hsp70 family represents one of the most highly conserved proteins identified to date, and has constitutive as well as regulated members in all the organisms examined (Mayer and Bukau, 2005). Hsp70 is one of the most abundantly induced proteins under a variety of stress conditions, while Hsc70 members are constitutively expressed under normal growth conditions. Most experimental work on the Hsp70 family has aimed to clarify the molecular mechanism of the chaperon system, with considerable recent progress in understanding the family's diverse functions in cells related to signalling pathways and protein homeostasis (for a review see Young, 2010). In addition, it is worth noting the recent advances in the molecular description of Hsp70 genes in a variety of species, as well as their evaluation in response to environmental stressors and toxicants (Dang et al., 2010; Karouna-Renier and Rao, 2009; Rhee et al., 2009; Ming et al., 2010; Simoncelli et al., 2010; Sinha et al., 2010; Su et al.,

**Abbreviations:** aa, amino acids; BBP, butyl benzyl phthalate; bp, base pairs; BPA, bisphenol A; DEHP, diethylhexyl phthalate; EE, ethinylestradiol; NP, 4-nonylphenol; PCP, pentachlorophenol; RACE, rapid amplification of cDNA ends; TBTO, tributyltin oxide.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +34 913987328; fax: +34 913987628.

E-mail address: [gmorcillo@ccia.uned.es](mailto:gmorcillo@ccia.uned.es) (G. Morcillo).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this paper.

1532-0456/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.003

2010; Waagner et al., 2010; Zhanng and Denlinger, 2010). It is now clear that compounds, including pesticides, metals and a variety of organic chemicals, are able to induce the production of some Hsps. However, depending upon the type of inducer there are variations in the pattern, magnitude, kinetics and duration of Hsp expression, which are still not clearly understood. Our knowledge of the underlying mechanisms governing the activation of Hsp70 genes is still far from complete. This environmental perspective adds further interest for studying the relevance of the Hsp70 gene as a toxicological endpoint after exposure to different environmental pollutants (Gupta et al., 2010).

Invertebrates, especially arthropods such as insects and crustaceans, constitute the vast majority of animal species on earth. Yet, they have received much less attention than vertebrates regarding the potential toxicity of most man-made chemicals. It is well known that aquatic insects are sensitive bioreporters of xenobiotic contamination, as exposure occurs during critical developmental stages, such as embryogenesis, larval development and pupation. The midge *Chironomus riparius* is an EPA- and OECD-approved test organism widely used in environmental toxicology (EPA, 1996; OCDE 2001). Chironomid larvae are employed in aquatic toxicity studies because of their ecological relevance in freshwater ecosystems and their association with benthic sediments, where the accumulation of many pollutants takes place. Survival tests and changes in developmental parameters are used in most studies to evaluate toxicity responses. Larval mouthpart deformities also function as indicators of anthropogenic stress (Martinez et al., 2003). Moreover, the giant polytene chromosomes from the salivary gland cells are a particularly suitable material for analysing the genotoxic effects of these compounds (Michailova et al., 2006). Although such studies have provided valuable data, novel molecular endpoints should also be used, in combination with classical reproductive endpoint and life-cycle testing, to increase our understanding of the mechanisms and modes of action of xenobiotics. The genes coding Hsps have recently acquired great relevance, and Hsp70 has been sequenced and evaluated as a biomarker of exposure to metals and insecticides in some species of chironomids, such as *Chironomus yoshimatsui* and *Chironomus dilutus* (Yoshimi et al., 2002; Karouna-Renier and Rao, 2009). The aim of the present study was to characterize the Hsp70 gene in *C. riparius* and to investigate transcriptional regulation of this gene under control and different stressful conditions, including temperature shifts and exposures to metals, insecticides and different organic chemicals classified as potential endocrine disrupting compounds (EU-Strategy for Endocrine Disruptors/Environment-Endocrine Disruptors Website). Developmental and reproductive impairments have been clearly demonstrated for these chemicals in a number of species, but relatively little is known about the subtle effects at the molecular level. Moreover, gene expression profiles could be a powerful new endpoint for ecotoxicological studies (Snell et al., 2003).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and treatments

The experimental animals were fourth instar larvae from the midge *C. riparius*. They were obtained from laboratory cultures; larvae were originally collected from natural populations in a non-polluted area of Valencia (Spain), and reared under standard laboratory conditions according to toxicity testing guidelines (US-EPA, 1996; OECD, 2001). Larvae were grown from egg masses in an aqueous culture medium (0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.025 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.01 mM  $\text{FeCl}_3$ ) supplemented with nettle leaves, commercial fish food, and cellulose tissue in polyethylene tanks (500 mL). Cultures were maintained under constant aeration at 20 °C and under standard light–dark periods (16L:8D). For experimental treatments, the

larvae were exposed to the chemicals diluted in a culture medium for 24 h with constant aeration at 20 °C in glass recipients (200 mL). No food or substrate was provided during exposure. Dose selection was based on results from previous studies in *Chironomus* sp. and other arthropods. Fourth instar larvae were submitted to 10 mM cadmium chloride (Cd) (Fluka), 1 mg/L butyl benzyl phthalate (BBP) (Aldrich), 0.01 µg/L diethylhexyl phthalate (DEHP), 1 µM pentachlorophenol (PCP) (Aldrich), 3 mg/L bisphenol A (BPA) (Aldrich), 10 mg/L 4-nonylphenol (NP) (Fluka), 1 ng/L tributyltin oxide (TBTO) (Aldrich), and 5 mg/L ethinylestradiol (EE) (Sigma), nominal concentrations. For temperature treatments, larvae were heat-shocked at 35 °C for 120 min in a preheated and aerated cultured medium, as described previously (Morcillo et al., 1988). Each treatment consisted of at least three replicates, and three independent experiments were performed in each analysis using samples from three different control egg masses. The control larvae used in each case were exposed to the same concentration of solvent as the corresponding treatment and were also measured in triplicate. Larvae were stored at –80 °C until RNA isolation was carried out.

### 2.2. RNA isolation

Total RNA was extracted from control and exposed fourth instar larvae (ten animals for each experiment) using a guanidine isothiocyanate based method, performed with a commercial kit (Trizol, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, frozen larvae were homogenated in one volume of Trizol and left for 5 min at room temperature. Then, 0.2 volumes of chloroform were added to each sample, mixed and left for 5 min at room temperature. Subsequently, the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and 15,000 g. Following transfer of the aqueous phase, the RNA was finally recovered by isopropyl alcohol precipitation (0.5 v/v), washed with 70% ethanol, and resuspended in DEPC water. The quality and quantity of total RNA were determined by agarose electrophoresis and absorbance spectrophotometry (Biophotometer Eppendorf), and purified RNA finally stored at –20 °C.

### 2.3. Amplification of HSP70

Total RNA extracted from *C. riparius* larvae, exposed for 2 h at 35 °C heat shock, was used for Hsp70 amplification. Based on the conserved sequences of Hsp70 genes from closely related species, two pairs of primers, Hsp70 (201–220) and Hsp70 (1006–987) (Table 1), were designed to amplify an Hsp70 cDNA fragment (806 bp) from *C. riparius*, while Hsp70 (852–873) and Hsp70 (2094–2076) were designed to amplify another Hsp70 cDNA fragment (1243 bp) from *C. riparius*. Cycling parameters for PCR amplification were one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1.5 min, with a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were purified (ExoSAP-kit One Step PCR Clean-up no. US78200, GE Healthcare) and sequenced with the primers [Hsp70 (201–220), Hsp70 (242–226), Hsp70 (341–319), Hsp70 (852–873), Hsp70 (1006–987), Hsp70 (1974–2001) and Hsp70 (2094–2076)] detailed in Table 1.

### 2.4. 5' and 3' RACE

The full-length sequence of Hsp70 was determined using 5' and 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), using commercial kits (Invitrogen) and following the procedures described by the manufacturer. New gene-specific primers were designed, based on sequence information obtained from the internal fragments. The sequences of all gene-specific primers used for RACE are given in Table 1.

For the 3' end RACE PCR, a cDNA template was obtained as described above, and a PCR was performed with gene-specific primer Hsp703' (1) and an adapter primer AUAP (RACE kit, Invitrogen). The PCR conditions were one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles

**Table 1**

Primers used for cDNA sequence and semi-quantitative RT-PCR of the HSP70 gene from *C. riparius*.

PCR objective	Oligo name	Primer DNA sequence
3' RACE	Hsp703' (1)	5'- GTGTACATCTGAATTATCATGGC-3'
	Hsp703' (2)	5'-GAAGAATTGAAGATCATTGAAGG-3'
5' RACE	Hsp705' (1)	5'- TATTTTGTGGATTCATTGCAAC-3'
	Hsp705' (2)	5'- AATCGTTCGAGTCTGTGAATGC-3'
β actin	F	5'-GATGAAGATCCTCACCGAACG-3'
Semi-quantitative RT-PCR	R	5'-CCTTACGGATATCAACGTCG-3'
Hsp70	F	5'-CATGTGACACGACCAAGAGA-3'
Semi-quantitative RT-PCR	R	5'-TTGCCACAGAAAGAACTCTG-3'
Hsc70	F	5'- CGTCTATGACTAAGGACAA-3'
Semi-quantitative RT-PCR	R	5'- GCTTCATTGACCATACGTTTC-3'
Hsp70 Sequence	Hsp70 (201-220)	5'- GGTATTGATCTGGCACAAC-3'
	Hsp70 (1006-987)	5'- GACAATGTTCTCTGGCTCG-3'
	Hsp70 (852-873)	5'- GGTGATACACATTTGGGTGGT-3'
	Hsp70 (2094-2076)	5'- CTTCTCACTGTGGACC-3'
	Hsp70 (1974-2001)	5'- GTACACGCACTTGTGCTCAATAATCG-3'
	Hsp70 (341-319)	5'- TGCATCACCAATCAATCGTTCCG-3'
	Hsp70 (242-226)	5'- AAAGACCAACACACG-3'
	Hsp70 (50-71)	5'- AAGTAAAGAAATCAAGCG-3'

at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 40 s, and 72 °C for 10 min. The PCR products were purified and sequenced with the primers [Hsp70 (1974-2001), Hsp703' (1), and Hsp703' (2)] detailed in Table 1.

For the 5' end RACE PCR, the RNA was transcribed by 5' RACE kit (Invitrogen) with gene-specific primer Hsp705' (1), and the cDNA was subsequently amplified with an adapter primer AAP (RACE kit, Invitrogen) and a gene-specific primer Hsp705' (2). The PCR conditions were one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 40 s; and 72 °C for 10 min. The PCR products were purified and sequenced with the primers [Hsp70 (242-226), Hsp70 (50-71), Hsp705' (1) and Hsp705' (2)] detailed in Table 1.

## 2.5. Sequence alignment, analysis and phylogenetic trees

Hsp70 fragments were sequenced from both strands using ABI Big-Dye 3.1 dye chemistry and ABI 3730XL automated DNA sequencers (PE Biosystems). The complete *C. riparius* HSP70 cDNA sequence was deposited in GenBank under Accession # ADL27420. In addition to the sequence reported here, we selected the following HSP70 family members for phylogenetic analysis: *Spodoptera exigua* (ACQ78180), *Mamestra brassicae* (BAF03555), *Bombyx mori* (NP\_001037396), *Helicoverpa zea* (ACV32640), *Anatolica polita* (ABQ39970), *Liriomyza huidobrensis* (AAW32098), *Delia antiqua* (AAY28732), *Rhagoletis pomonella* (ABL06948), *Aedes aegypti* (ACJ64194), *Chironomus tentans* (AAN85117), *C. yoshimatsui* (BAD42358), *Culex quinquefasciatus* (XP\_001864723), *Drosophila pseudoobscura* (XP\_001358499), *Drosophila virilis* (XP\_002056192), *Drosophila grimshawi* (XP\_001990182), *Acyrtosiphon pisum* (XP\_001949837), *Mus musculus* (AAA37864), *Gallus gallus* (AAA48825) and *Alligator mississippiensis* (BAF94142).

Sequence alignments of amino acid sequences from 20 inducible HSP70 family members were carried out using the Clustal X program, and confirmed by MAFFT version 6. A phylogenetic tree was generated by the MEGA 4 program using the neighbour-joining method. The Poisson model was used for distance estimation and bootstrap values were calculated with 1000 replicates.

## 2.6. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Following the instruction manual, 1 µg of total RNA with 0.5 µg Oligo dT<sub>20</sub> (Invitrogen) was employed for reverse transcription with M-MLV enzyme (Invitrogen). The synthesized first-strand cDNA was stored at −20 °C until used as templates for PCR reactions. Multiplex reactions were carried out using gene-specific primers, with β-actin as reference gene. Gene-specific primers for actin and Hsc70 were designed from DNA sequences present in databases, following a search in the FASTA invertebrate database to detect conserved regions. The Hsc70 sequence from *C. yoshimatsui* (AF448434) was compared with sequences from *C. tentans* (AF448433), *Ceratitis capitata* (U20256), *Drosophila melanogaster* (AY084193), *Manduca sexta* (AF194819), *Locusta migratoria* (AY178988), *B. mori* (AB084922), *Chilo suppressalis* (AB206478), *Trichoplusia ni* (U23504) and *M. brassicae* (AB251896) and a highly conserved region was defined and used to design a set of primers (Table 1). The primers were designed to produce different-sized PCR products to allow simultaneous multiplex analysis with β-actin as an internal control. In notated cases, actin amplification was carried out using a mix of primers–dideoxy primers to obtain a similar signal with the cycles used. Sequences and fragment size of each gene-specific pair of primers are shown in Table 1. *C. riparius* gene fragments were cloned and sequenced to ensure that they matched the selected genes.

PCR was performed in 20 µL with 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Biotools, Spain), 0.4 µM of each primer and 0.2 µL of Taq polymerase (Biotools, Spain) under the following conditions: denaturation for 30 s, annealing for 30 s and elongation for 40 s. A MiniOpticon Thermocycler (Bio-Rad) was used. After several trials to ensure log-phase amplification, 32 cycles were carried out, with an annealing temperature of 54 °C, to amplify the fragments corresponding to Hsp70 and Hsc70. The amplified PCR products were run in a 9% acrylamide gel at 60 V for 3 h in 1× TGE buffer (40 mM Tris–Cl (pH 8.5), 200 mM glycine, and 2.5 mM EDTA), visualized after ethidium bromide staining and quantified with Chemigenius3 (Syngene), using GeneSnap 6.05 and GeneTools 3.06 software. Values of density across the whole bands were normalized against the actin standard, and the relative expression levels were then calculated. The level of expression in non-exposed control larvae was considered as background level or 1. To verify reproducibility, the analysis was repeated three times in independent experiments, with three replicates for each sample. The data were statistically analysed using SPSS software 11.5. The significant differences between groups were determined using the analysis of variance (ANOVA), with the Bonferroni method as the post hoc test. The level of statistical significance employed in all cases was p<0.05.

## 2.7. In situ hybridization and immunodetection

Salivary glands were dissected and fixed in acetic acid:ethanol (3:1), squashed in 50% acetic acid and the slides dehydrated in absolute ethanol. Subsequently, FISH was carried out essentially as described previously (Martínez-Guitarte et al., 2007). The squashes were air-dried and treated with 2× SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate) at 65 °C for 45 min, dehydrated in 50–100% ethanol series for 10 min and treated with 0.07 N sodium hydroxide for 3 min. Finally, the slides were thoroughly washed with 1× PBS before applying the probe. The sequence of the Hsp70 probe was labelled by nick translation with Digoxigenin (Roche), denatured by boiling in water for

**Fig. 1.** (a) Nucleotide and amino acid sequences of *Chironomus riparius* HSP70. A long (167 bp) 5' untranslated region (UTR) that is rich in adenosine (56%). A 211 bp 3' UTR (not including the poly A tail) that contained one possible polyadenylation signal (AATAAA), and three AU-rich elements (ARE; ATTTA). Protein motifs are marked: ■, three classical HSP signature motifs; □, ATP/GTP-binding site motif A (AEAYLGKT); △, cytosolic HSP70 character sequence (EEVD); ■, bipartite nuclear targeting sequence (KRKFKKIDITDKRAVRR); ▲, non-organelle consensus motif (RARFEEM). (b) Schematic diagram of the protein domains of *Chironomus riparius* HSP70 showing a conserved ATPase domain in the N-terminal (aa 1–387); a linker region (aa 388–393); the peptide binding domain (aa 394–553); the variable region (aa 554–641) and the conserved C-terminal EEVD motif.



a

```

1  aatcatttcaaaaaagataactgaacaagaaagagctcagaagagtacaagtaaaagaa
61  aattcaaaagcgaatcaaaaagatttcaaagtttaaagtgaaaaaaattgtgaaattgaa
121  taaaattaaattttgtgaattgaaagtaaaataaaaaataaaaaatgcccagcaaaac
1  M P A K
181  agaaaaacaggaacagcaattggtattgatcttggcacaacatactcgtgtgttggtgtct
5  Q K T G T A I G I D L G T T Y S C V G V
241  ttcaacatggaaagttgagatcatagccaatgagatgggaatagaacaacaccaagtt
25  F Q H G K V E I I A N E M G N R T T P S
301  atgttgcatccagactcggaacgattgattgggtgatgcagctaaaaatcaggttgcaa
45  Y V A F T D S E R L I G D A A K N Q V A
361  tgaatccacaaaatacagattttgatgcaaaacgattaattggacgtaaatttgatgatg
65  M N P Q N T V F D A K R L I G R K F D D
421  aaaagattcaagctgatatgaacattggccatttaaagtcataatgattgtggaagac
85  E K I Q A D M K H W P F K V Y N D C G K
481  caaagatccaagttgaatttaaaggagaacaaaagagatttgcaccagaagaatcagtt
105  P K I Q V E F K G E Q K R F A P E E I S
541  caatggcttgacaaagatgaagagactgctgaagcatatttaggcagagaagtcacag
125  S M V L T K M K E T A E A Y L G Q K V T
601  atgcagttgtaactgtaccagcttatttcaatgactcgcaacgtcaagcaaaaaagatg
145  D A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D
661  caggtgctatcgccggtctgaatgtcttgagaatcatcaatgaaccaactgcagcagcac
165  A G A I A G L N V L R I I N E P T A A A
721  tagcttatggtcttgataagaatcttaaaggagaacgaaatgtttaatttttgatcttg
185  L A Y G L D K N L K G E R N V L I F D L
781  gtggtggaacttttgatgtctcaatcttaacaattgatgaagggttcattatttgaagtca
205  G G G T F D V S I L T I D E G S L F E V
841  gatcaacagctggtgatacacatttgggtggtgaagactttgacaacagattagtaaatc
225  R S T A G D T H L G G E D F D N R L V N
901  atttcattgaagaatttaagcgttaaacataaagcagacttaagcaagaatattcgtgcat
245  H F I E E F K R K H K A D L S K N I R A
961  taagaagattaaagacagcatgtgaacgagccaagagaacattgtcatcatctacagaag
265  L R R L R T A C E R A K R T L S S S T E
1021  cttcaattgaaatttgatgcattacatgaaggagttgatttctattcaaatcacaagag
285  A S I E I D A L H E G V D F Y S K I T R
1081  caagatttgaagaatgaatatggatttatttagatcaacacttgaaccagttgaacgtg
305  A R F E E M N M D L F R S T L E P V E R
1141  cattaagagatgcaaaattcgacaagagtcaaattcatgatgttgttcttctgttggtgat
325  A L R D A K F D K S Q I H D V V L V G G
1201  caactcgattccaaagattcagaaaaatgcttcaagatttctctctggcaaaagcttga
345  S T R I P K I Q K M L Q D F F S G K S L
1261  acttttcaatttaaccagatgaagcagttgcatatggagcggcagttcaagcagctatcc
365  N F S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I
1321  taaccggtgatagtagctcaacaatccaagatgttttactgttgatgtgacgccattat
385  L T G D S S S T I Q D V L L V D V T P L
1381  cattgggaattgaaacagctggttgagtcagcaaaaacttattgaaagaatgctcgaa
405  S L G I E T A G G V M T K L I E R N A R
1441  ttccatgcaagcaacagaaaaacatttacaacatattcagataatcagcctgcagttacta
425  I P C K Q Q K T F T T Y S D N Q P A V T
1501  ttcaagtatttgaaggagaacgagcaatgacaaaagataaattatttgggaacattta
445  I Q V F E G E R A M T K D N N L L G T F
1561  atttgactggaattgcaccagcaccaagaggaattccacaaattgaagtcacattcgatc
465  N L T G I A P A P R G I P Q I E V T F D
1621  ttgatgctaatggcatcttgaatgtatcagccaaagatagttcaactggaaaacaagaga
485  L D A N G I L N V S A K D S S T G K Q E
1681  caattacaatcaagaatgataaaggacgtctctcaaaggctgaaatcgatcgaaatgcttt
505  T I T I K N D K G R L S K A E I D R M L
1741  ctgaggctgaaaaatatcgtgacgaagatgaaaagcatcagcaacgaattcaagcaagaa
525  S E A E K Y R D E D E K H Q Q R I Q A R
1801  atcaacttgaaggttacatcttggatgtaacaacagcagttgaagatgctccagctggca
545  N Q L E S Y I F G C K Q A V E D A P A G
1861  aattgtagaagatgacaagaaggtcgcttctgataagtgatcatctgaattatcatggc
565  K L S E D D K K V V R D K C T S E L S W
1921  ttgattccaacacacttgcgtgaaaaggaagaatttgaagatcatttgaaggatgtacagc
585  L D S N T L A E K E E F E D H L K D V Q
1981  gagtttgggtccaataatggctaaaatgctggcgagcgggtgcacaaaaagctggtg
605  R V C G P I M A K M H G G A G A Q K A G
2041  gatgtggtgcacaaagtgacagagagcatattcaggtccaacagttgaggaagtcgat
625  G C G A Q S G Q R A Y S G P T V E E V D
2101  aaattagtcaaaatttaagagacaccaaatttgcgtttatgctttaaagatactcaatt
2161  cgtttaatcatattggatgtttgatgaataatttaaacacataactaagtcaaaagtag
2221  ggaacttatcggtctttttaaatttttattactgctgtataaaattgttaaatattaag
2281  ttatgatataaaggtataatttatgttgagttgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

10 min and rapidly cooled on ice. The hybridization buffer was 50% deionized formamide and 4× SSC, 0.4% SDS. Each slide was treated with 95 pmol of probe and incubated overnight at room temperature. After hybridization, the slides were washed twice in PBS, 0.1% Tween 20 for 10 min. For detection of the probe, slides were incubated for 1 h in anti-digoxigenin IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (Roche) diluted 1:100 in PBS, 0.1% Tween 20, and 1% Blocking reagent (Roche). Following the washes, the slides were stained with 2 µg/mL DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) for 3 min and mounted in ProLong (Invitrogen) anti-fading. For immunodetection of anti-RNA polymerase II antibodies, salivary gland cells were microdissected in Ringertz's solution (128 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 1.9 mM CaCl<sub>2</sub>) under a Nikon stereomicroscope. The salivary glands were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (Merck), 7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl (PBS) and squashed in 50% acetic acid. The fixed tissues were then washed in PBS and incubated for 30 min in 20 mM glycine. After washing in PBS, they were permeabilised in a solution containing 1% Nonidet P40 and 0.5% sodium deoxycholate in PBS for 15 min. Slides were incubated in a PBS/BSA blocking solution or a TBST/Superblock solution for 1 h at room temperature. Thereafter, they were incubated in a humidified chamber at room temperature for 1 to 2 h in 1× PBS, 2% bovine serum albumin, 0.1% Tween (BTP) with the primary antibody, anti-RNA polymerase II monoclonal antibody (1:50) (Progen). After three intensive 10 min washes in PBST, they were incubated for 1 h with the appropriate anti-mouse antibodies conjugated with rhodamine or Texas Red (Sigma), diluted 1:100 in BTP. Slides were washed thoroughly three times for 15 min each with PBS 1×/0.01% Tween 20. The cells were then counterstained with 2 µg/mL DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) for 5 min and mounted in anti-fading Vectashield (Vector Laboratories). All slides were examined under a Zeiss Axiophot photomicroscope equipped with an epifluorescence system and a Photometrics Cool Snap CCD camera. Images were processed with Adobe Photoshop 7.0.

### 3. Results

#### 3.1. Sequence analysis, chromosomal localization and phylogenetic analysis of Hsp70

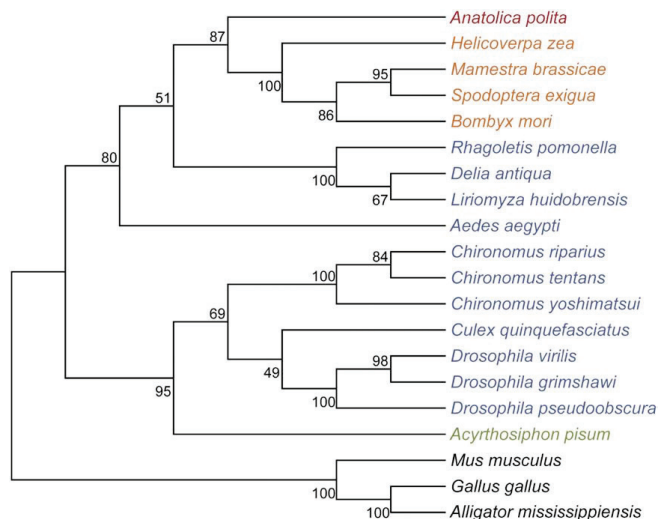
The length of the *C. riparius* Hsp70 open reading frame was 1935 bp encoding a protein with 644 amino acid residues (GenBank Accession no. HM769899). The full length of nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence are shown in Fig. 1. The gene included a long 5' untranslated region (UTR) (167 bp) that is rich in adenosine (56%), a characteristic feature of 5' UTRs of previously identified HSPs, including *C. dilutus* Hsp70 and Hsp70's from other species. The 211 bp 3' UTR (not including the poly A tail) contained one possible polyadenylation signal (AATAAA) and three AU-rich elements (ARE; ATTTA) (Fig. 1a). Analysis of genomic DNA showed that the Hsp70 gene has no introns. Amino acid sequence analysis indicated a deduced molecular weight of 70.93 kDa for the HSP70 protein and conserved signature motifs. Classical HSP protein signature motifs include IDLGTTYS (aa 13–20), IFDLGGGTFDVSIL (aa 201–214) and VVLVGSTRIPIKIQN (aa 339–353). Three other typical motifs are also found in the Cr-Hsp70. The first is a deduced ATP–GTP-binding site, AEAYLGQK (aa 135–142). The second is a deduced bipartite nuclear localization signal, RKHKADLSKNIRALRR (aa 251–267). The third is a non-organellar consensus motif RARFEEM (aa 304–310). The sequence of the ATPase domain (aa 1–387) of Hsp70 is highly conserved, while the C-terminal domain is less conserved than the ATPase domain (Fig. 1b) (Su et al., 2010). This Hsp70 contains the conserved EEVD motif in the C-terminal, but lacks the conserved tetrapeptide repeat (GGMP) located at the C-terminal domain, which mediates the association of Hsp70 with Hsp90 into a multichaperone complex, found in other species.

The complete *C. riparius* Hsp70 amino acid sequence was deposited in GenBank under Accession # ADL27420. Multiple sequence alignment showed that the deduced amino acid sequence of *C. riparius* shared high similarity with other previously described Hsp70s. The *C. riparius* Hsp70 exhibited 96.6% and 95.2% identity at the amino acid level with *C. dilutus* and *C. yoshimatsui* respectively, 80% with *D. melanogaster*, and 75% with *Homo sapiens*. Using MEGA 4 programs, a phylogenetic tree was constructed, based on the sequence of Hsp70 from different species. The relationships displayed in the phylogenetic tree were consistent with the traditional taxonomy of insects and virtually identical between the protein-parsimony tree (not shown) and the neighbour-joining tree (Fig. 2).

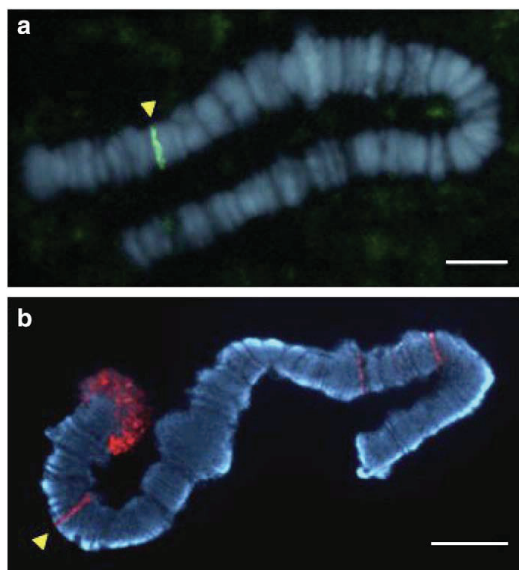
Localization of the Hsp70 gene on polytene chromosomes from salivary gland cells, by *in situ* hybridization, showed a single locus located on region III-A3 at the third chromosome (Fig. 3a). This region was consistently puffed after exposure to high temperatures (2 h 35 °C), a condition that inhibited most chromosomal loci, while activating the heat-shock genes, as shown by immunostaining using anti-RNA polymerase II antibodies (Fig. 3b).

#### 3.2. Transcriptional response of the Hsp70 gene under different experimental treatments

To assess the inducibility of the Hsp70 gene, mRNA expression in *C. riparius* fourth instar larvae was analysed by semi-quantitative RT-PCR, under normal larval growth conditions and various treatments. The different treatments assayed, summarized in Table 2, were selected on the basis of previous data obtained from the literature. All treatments were for short times and in acute doses. Mortality rates of larvae were determined for every toxicity assay. No significant differences in larval survival were found for the times and concentrations selected, for each chemical, or for the temperature shock applied (Table 2). In all cases, expression of Hsc70 was also analysed as a measurement of the effect of the different stressful treatments on a housekeeping gene, and to find out if there was differential behaviour by these two related Hsc70/Hsp70 genes. Following normalization to avoid random effects on sampling data, the expression of mRNA was analysed in multiplex RT-PCR in relation to actin mRNA levels. In each case, gene expression patterns were compared to those obtained from control cultures or, where required by chemicals in certain treatments, from control cultures exposed to the same concentration of solvents. To avoid differences being caused by experimental procedures or those intrinsic to the larvae being sampled, for each condition, three independent experiments from different cultures, as well as three replicates, were carried out. Fig. 4 shows the results obtained in Hsp70 and Hsc70 gene expression profiles for the different experimental treatments assayed. When larvae were submitted to a temperature shift of 15 °C above the normal temperature in the control culture, the expression of Hsp70 experienced a significant (four-fold) increase, whereas Hsc70 did not show significant changes. Similarly, in six of the eight experimental conditions assayed, Hsp70 mRNA abundance increased. Cadmium chloride (Cd), butyl benzyl phthalate (BBP), diethylhexyl phthalate (DEHP), bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (NP), and ethinylestradiol (EE) treatments resulted in a significant increase in Hsp70 mRNA ( $p < 0.05$ ), when compared with their respective control samples of untreated larvae exposed to the same concentration of solvent. However, there were no significant changes in the levels of Hsp70 mRNA after 24-hour treatments with pentachlorophenol (PCP) or tributyltin oxide (TBTO). Longer exposures to these two latter compounds provoked a high mortality of larvae (i.e. 48 h 1 µM PCP 5% survivals). In contrast to Hsp70, the cognate form Hsc70 was not significantly altered by any of the treatments assayed, with levels of mRNA Hsc70 nearly identical to those found in the corresponding control samples.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree of HSP70 sequences, constructed by the neighbour-joining method. The values on the branches of the consensus tree indicate the number of times the partition of the species into the two sets, separated by that branch, occurred among the 1000 bootstrap replicates. The tree is based on alignment of the amino acid sequences of *Chironomus riparius* HSP70 and other proteins corresponding to four major insect taxa. In orange, Lepidoptera, *Spodoptera exigua* (ACQ39970), *Mamestra brassicae* (BAF03555), *Bombyx mori* (NP\_001037396), and *Helicoverpa zea* (ACV32640). In red, Coleoptera, *Anatolica polita* (ABQ39970). In blue, Diptera, *Liriomyza huidobrensis* (AAW32098), *Delia antiqua* (AAV28732), *Rhagoletis pomonella* (ABL06948), *Aedes aegypti* (ACJ64194), *Chironomus tentans* (AAN85117), *Chironomus yoshimatsui* (BAD42358), *Chironomus riparius* (ADL27420), *Culex quinquefasciatus* (XP\_001864723), *Drosophila pseudoobscura* (XP\_001358499), *Drosophila virilis* (XP\_002056192), and *Drosophila grimshawi* (XP\_001990182). In green, Hemiptera, *Acyrtosiphon pisum* (XP\_001949837). Vertebrate species were used as outgroups: *Mus musculus* (AAA37864), *Gallus gallus* (AAA48825) and *Alligator mississippiensis* (BAF94142).



**Fig. 3.** (a) Localization of the *hsp70* gene in the *Chironomus riparius* genome. Using digoxigenin-labelled probes, a single signal stained in green with FITC is detected by FISH at polytene location III-A3B on the right arm of third chromosome counterstained in blue with DAPI. (b) Transcription at locus IIIA3 detected by antibodies against RNA polymerase II in polytene chromosomes of salivary glands from *Chironomus riparius* larvae heat-shocked at 35 °C. The heat-shock-induced locus at region III-A3 stained in red with Texas Red anti-RNA pol II antibodies is marked by arrowheads, while a typical induced telomeric puff (T-BRIII) is marked by a white arrow. Bar 10 µm.

#### 4. Discussion

HSPs are among the most ancient and highly conserved of all proteins. Homologues of HSPs occur in every species in which they have been sought, and in all kingdoms of living things, even in the smallest genomes. HSPs have been found in every cell type under both normal and stressed conditions, as they play a basic role in fundamental cellular processes (Feder and Hoffman, 1999). In our study, the *Hsp70* gene in *C. riparius* has been characterized and its activity evaluated under different experimental treatments, comparing its behaviour with that of the *Hsc70* gene.

The sequence of the *C. riparius* *Hsp70* gene and the deduced HSP70 protein conserved the typical motifs that have been previously described (Sonoda et al., 2006). At the amino acid level it shared a high level of identity with the HSP70 proteins of *C. yoshimatsui* and *C. tentans* (Yoshimi et al., 2002; Karouna-Renier and Rao, 2009). Different domains could be identified and, in particular, the ATPase domain was the most conserved. Interestingly, this HSP70 lacks the conserved tetrapeptide repeat (GGMP) located at the C-terminal domain, which mediates the association of HSP70 with HSP90 into a multichaperone complex and that has been found in other species (Su et al., 2010; Rhee et al., 2009; Sinha et al., 2010). The cytosolic HSP70-specific motif (EEVD) is located at the C-terminal. The *Hsp70* gene was localized by in situ hybridization at region III-A3 of the right arm of the third polytenic chromosome, which suggests the presence of a single locus in the *C. riparius* genome. This contrasts with the situation for *D. melanogaster*, where two different loci (87A7/87C1) were identified in chromosome 3 (Gupta et al., 2010). This III-A3 region binds to RNA polymerase II, as shown by immunostaining, and corresponds to the locus that appeared *de novo* induced as a puff, along with other well characterized HS-puffs, after thermal or CO<sub>2</sub> treatments, which induced heat shock or anoxia stress, respectively (Baretino et al., 1988; Morcillo et al., 1988). As there is no genome project for most invertebrate aquatic species, gene sequence information adds a new



**Table 2**

Characterization of the different treatments assayed.

Stress treatment	Characteristics	Concentration	Time	Survival (%)	References
Temperature (HS)	+15 °C over control culture	35 °C	2 h	93	Morcillo et al. (1988)
Cadmium chloride (Cd)	Heavy metal	10 mM	24 h	82	Planelló et al. (2007)
Butyl benzyl phthalate (BBP)	Plasticizer	1 mg/L	24 h	83	Liu et al. (2009)
Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	Plasticizer in PVC	0.01 mg/L	24 h	100	Park and Kwak (2008)
Bisphenol A (BPA)	In epoxy resins and polycarbonates	3 mg/L	24 h	96	Kang et al. (2007)
4-Nonylphenol (NP)	Industrial surfactant	10 mg/L	24 h	85	Segner et al. (2003)
Pentachlorophenol (PCP)	Organochloride biocide	1 µM	24 h	98	Ha and Choi (2008)
Tributyltin oxide (TBTO)	Insecticide	1 ng/L	24 h	100	Fernández-Freire et al. (2005)
Ethinylestradiol (EE)	Synthetic estrogen contraceptive pills	5 mg/L	24 h	100	Hahn and Schulz (2002)
					Dussault et al. (2008)
					Segner et al. (2003)

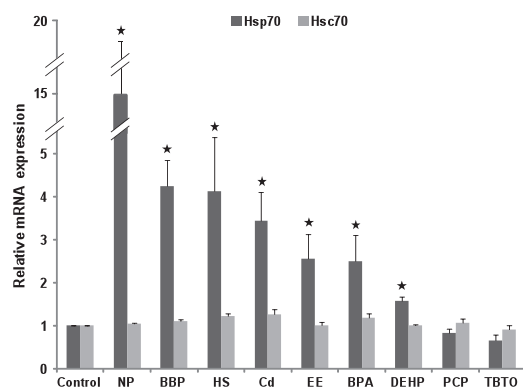
tool for studying gene–environment interactions. In the future, the use of siRNA, DNA microarray and proteomics will have considerable impact on the ecotoxicological assessment of pollutants, and on our understanding of their mechanism of action. Moreover, localization of Hsp70 in polytene chromosomes makes it possible to directly visualize the effect of pollutants by further cytogenetic analysis.

As *C. riparius* is one of the test species recommended by the OECD for acute toxicity testing, one of the aims of this work was to evaluate the early response of the Hsp70 gene under different environmental stressors, including temperature shifts and short-term exposures to different xenobiotics and hormone analogues. The chemical compounds selected are classified as potential endocrine disrupting compounds. To determine if the expression of Hsp70 was differentially regulated by these various stressors, mRNA levels were analysed by semi-quantitative RT-PCR. Accumulated evidence has shown that HSP-proteins are induced by environmental and pathological stress, encouraging the current research into the toxicological, medical and therapeutic implications of these proteins. It is generally acknowledged that induction of the Hsp70 protein reflects transcriptional activation of the gene by specific transcription factors and DNA

promoter elements (HSF and HSE, respectively). Nevertheless, it should be noted that analysis of mRNA levels is a more accurate approach for evaluating the subtle changes provoked by potential stressors than that using methods based on protein levels (ELISA and Western), due to the low specificity of most antibodies for distinguishing between the different constitutive and inducible forms of 70 kD family proteins. In our study, using specific gene probes, the roles of Hsp70 and Hsc70 were simultaneously analysed to demonstrate the differential regulation of these two genes under the experimental treatments assayed. Although there is a great deal of data about Hsp70 gene activity under environmental stressors, little is known about the comparative function of these genes or about the differential regulation of their activity in the toxic response.

As expected, the Hsp70 gene was significantly upregulated by a temperature shock, showing levels of mRNA up to four-fold higher than those of controls after 2 h at 35 °C. Surprisingly, in contrast, Hsc70 maintained a constitutive expression level, it was not up- or down-regulated despite a sudden shift of 15 °C above the normal growth temperature. At this increased temperature, there was a drastic reduction in the transcriptionally active sites in polytene chromosomes, with the Hsp70 locus and other HS-loci being the only ones brightly stained by RNA polymerase II antibodies (Fig. 3), while it has been shown that cultures can survive up to 12 h (Morcillo et al., 1988).

In addition, most of the chemical treatments tested, except pentachlorophenol (PCP) and tributyltin oxide (TBTO), also triggered activation of the Hsp70 gene at the chosen concentrations. However, none of the experimental treatments assayed provoked a significant alteration in the expression level of the Hsc70 gene. Butyl benzyl phthalate (BBP), 4-nonylphenol (NP), cadmium chloride (Cd), ethinylestradiol (EE), bisphenol A (BPA), diethylhexyl phthalate (DEHP) produced a significant increase in Hsp70 mRNA levels early after exposure. Remarkable differences were found in the levels of activation between the different compounds, with NP inducing the highest increase (of up to 15 fold) at the dose assayed. Nonylphenol is a stable and persistent derivate of nonylphenol ethoxylate, widely used as a component of detergents, paints, pesticides and many other products. The potency of NP as an estrogen receptor agonist has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* in fish and mammals (Folmar et al., 2002), but little is known about its endocrine disrupting effects in invertebrate organisms (Lye et al., 2008). Despite, or due to, the drastic activation of Hsp70 observed in *C. riparius*, NP is not a very toxic compound, surviving to doses up to 100 mg/L. Similar concentrations of NP were found to alter the expression of some haemoglobin genes in this organism (Ha and Choi, 2008). DEHP induced a lower (1.6×) but significant increase in Hsp70, and has also previously been shown to increase Hsp90 and Hsp40 levels in *C. riparius* (Park and Kwak, 2008). DEHP is a widely used plasticizer often found in freshwater systems and dominated the phthalate concentrations (up to 8.44 mg/kg in sediments) evaluated in water samples from Germany (Fromme et al., 2002). At the doses and



**Fig. 4.** Analysis of the expression of Hsp70 and Hsc70 genes under different stressful conditions in *C. riparius* fourth instar larvae: 4-nonylphenol (NP), butyl benzyl phthalate (BBP), heat-shock (HS), cadmium (Cd), ethinylestradiol (EE), bisphenol A (BPA), diethylhexyl phthalate (DEHP), pentachlorophenol (PCP), and tributyltin oxide (TBTO). RT-PCR experiments were performed using gene-specific primers for Hsp70 and Hsc70 and for the constitutively expressed gene  $\beta$ -actin, which was used as an internal control (Table 1). The primers were designed to produce different-sized PCR products to allow for simultaneous analysis. The raw values were normalized against  $\beta$ -actin, and the data used to calculate relative expression levels. The relative values are represented; the expression level under control conditions was set to 1. The average and standard errors of measurements taken in three independent experiments with three sample replicates for each stage are shown. \*Significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

temperature tested, the rest of the compounds induced an increase in Hsp70 gene activity equivalent to that of a heat shock, the classical inducer of these genes. Our study reinforces the interest of the Hsp70 gene as a broad range marker of cellular stress (induced by metals, EDCs, herbicides and antibiotics), confirming previous data from our and other laboratories (Lee et al., 2006; Karouna-Renier and Rao, 2009; Park and Kwak, 2008; Planelló et al., 2008, 2010) in different species of chironomids. Heavy metals are considered to be among the most consistent inducers of Hsp70 in the different organisms studied to date (Gupta et al., 2010). Nevertheless, it is worth pointing out that there are some differences in the literature about the effect of other chemical compounds on Hsp70 in different experimental systems. For example, and contrary to our data, NP was found to downregulate the Hsp70 gene in the copepod *Tigriopus* whereas, as in our study, this gene was induced by BPA (Rhee et al., 2009). For a particular chemical, a similar mode of action at the cellular level is most likely, at least in related organisms; the different induction patterns might reflect differences in the previous basal levels of Hsps, due to culture and environmental conditions rather than a different mode of action. Induced thermotolerance and/or cross-tolerance to other stressors should also be considered, as this has long been demonstrated for heat-shock proteins in other species (Carretero et al., 1991).

Although the sensitivity of the cellular stress response makes the Hsp70 gene attractive in ecotoxicology studies, the screening of a particular Hsp may not provide a sufficiently sensitive bioindicator, as for example in the cases of PCP and TBTO. Pentachlorophenol (PCP) belongs to the chlorophenol family; it is highly toxic and persists in the environment. It has been widely used as a general biocide and, more particularly, as a wood preservative. Although there is evidence of the effect of PCP on oxidative metabolism, no studies have yet examined its direct effect on gene expression. PCP did not alter Hsp70 gene levels in *C. riparius* after 24 h of exposure, although after a further 24 h the larvae died (8% survival after 48 h). In a similar way, it has been shown that HSP70 protein levels (measured by ELISA) did not change in *Raphidocelis subcapitata* (Bierkens et al., 1998). Moreover, the TBTO treatments assayed did not activate the Hsp70 gene, even though acute endocrine disrupting effects have been previously reported for this compound in this species, differentially affecting ecdysteroid synthesis and development in males and females (Hahn and Schulz, 2002). Although it is tempting to speculate about the possible relationship between a lack of HSP70 and the high sensitivity and mortality induced by these two biocides, more in depth research is required to assess a causal relationship. In recent years, it has been suggested that activation of heat-shock proteins, and in particular HSP70, in response to environmental insults may play an important role in protecting cells against a broad spectrum of potentially lethal pollutants (Gupta et al., 2010). Despite extensive research, new data are still required to be able to generate a complete picture of Hsp70 regulation and its relationship to cellular toxicity.

In contrast to the differential effects observed in Hsp70 activity, none of the experimental treatments assayed provoked a significant alteration in the expression levels of the Hsc70 gene. These results suggest that the treatments assayed were not sufficiently severe to be able to inhibit a normally active gene, which seems to have a robust resistance to the effects of toxicants, and appears to be differentially regulated than Hsp70. Constitutive 70 kD proteins have “housekeeping” functions within a cell, related to protein assembly, folding, translocation and denaturation (Feder and Hoffman, 1999). It has been shown that some metals, such as copper, upregulate both Hsp70/Hsc70 genes in *C. tentans* (Karouna-Renier and Zehr, 2003; Karouna-Renier and Rao, 2009).

Our results show that the Hsp70 gene was induced by the synthetic steroid ethinylestradiol (EE) in *Chironomus*, which is consistent with some reports of heat-shock protein expression induced by ecdysone in *Drosophila* and estrogen in mammals (Ryan and Hightower, 1998). It has been suggested that there may be a functional relationship

between steroid hormones (such as ecdysone in insects and estrogen in mammals) and heat-shock proteins. Indeed, it has been shown that three proteins, HSP90, HSC70 and HSP70, are components of the hormone nuclear receptor complex (Nolen and Morimoto, 2002).

A major advantage for using subcellular biomarkers, such as stress protein genes, is an increased sensitivity and earlier response, when compared to these characteristics for conventional parameters at higher levels of biological organization. However, the predictive power may be limited to the toxicant employed and the model system under defined environmental conditions. As marked differences were seen in the ability of relevant toxicants to induce Hsp70, a question mark has been raised about the universal response of the Hsp70 gene to cytotoxicity. Different stressors can induce distinct stress response pathways by targeting specific genes. More extensive research is required to increase the utility of heat-shock proteins in studies predicting the level of toxicity based on stress gene expression in model organisms.

In summary, we found that Hsp70 gene expression in the aquatic larvae of *C. riparius* is upregulated during exposure to a broad sample of environmental pollutants classified as endocrine disruptors, including metals such as cadmium (Cd), organic man-made compounds, such as polyphenols and phthalates (butyl benzyl phthalate, BBP; diethylhexyl phthalate, DEHP; bisphenol A, BPA; and nonylphenol, NP), and synthetic steroids (ethinylestradiol, EE), where neither the survival of the larvae is affected nor the Hsc70 expression is altered by the exposure conditions. These results suggest that this gene could be useful as a rapid and sensitive marker of exposure in ecotoxicological testing. However, other compounds assayed, such as the biocide pentachlorophenol (PCP) and tributyltin oxide (TBTO), did not increase Hsp70 gene expression, nor alter Hsc70 mRNA basal levels, but they were able to kill the larvae some hours later. In conclusion, the Hsp70 gene in *C. riparius* showed a different susceptibility to the toxic effects of different environmental pollutants. Its potential use for predicting the toxicity of chemicals merits further research to validate its sensitivity and specificity. Finally, gene expression studies can provide important insights into how genomes react to stressful events and environmental hazards, which are likely to be even more frequent as aquatic systems become increasingly polluted.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. José Luis Díez (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) for helpful discussions and Dr T. Carretero (University of Zaragoza) and Ted Cater for critical reading of the manuscript. This work was supported by grant CTM-2009-07189 of the Ciencias y Tecnologías Medioambientales, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

## References

- Barettoni, D., Morcillo, G., Díez, J.L., 1988. Induction of the heat-shock response by carbon dioxide in *Chironomus thummi*. *Cell Differ.* 23, 27–36.
- Bierkens, J., Maes, J., Vander Plaetse, F., 1998. Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 101, 91–97.
- Carretero, M.T., Carmona, M.J., Díez, J.L., 1991. Thermotolerance and heat shock proteins in *Chironomus*. *J. Insect Physiol.* 37, 239–246.
- Dang, W., Hu, Y.H., Zhang, M., Sun, L., 2010. Identification and molecular analysis of a stress-inducible Hsp70 from *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 600–607.
- De Pomerai, D., 1996. Heat shock proteins as biomarkers of pollution. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 279–285.
- Dussault, E.B., Balakrishnan, V.K., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2008. Chronic toxicity of the synthetic hormone 12alpha-ethinylestradiol to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2521–2529.
- EPA (US), 1996. Chironomid sediment toxicity test, ecological effects tests guidelines. EPA 712-C-96-313; 2nd ed. EPA 600/R-99/064, Washington DC, USA.
- Feder, M.E., Hoffman, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Fernández-Freire, P., Labrador, V., Pérez Martín, J.M., Hazen, M.J., 2005. Cytotoxic effects in mammalian Vero cell exposed to pentachlorophenol. *Toxicology* 210, 37–44.

- Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H., Grau, E.G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. *Aquat. Toxicol.* 60, 101–110.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–1438.
- Gupta, S.C., Shrama, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86, 377–384.
- Ha, M.H., Choi, J., 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere* 71, 1928–1936.
- Hahn, T., Schulz, R., 2002. Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1052–1057.
- Kang, J.H., Aasi, D., Katayama, Y., 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 607–625.
- Karouna-Renier, N.K., Rao, K.R., 2009. An inducible HSP70 gene from the midge *Chironomus dilutus*: characterization and transcription profile under environmental stress. *Insect Mol. Biol.* 18, 87–96.
- Karouna-Renier, N.K., Zehr, J.P., 2003. Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in the midge larvae (*Chironomus tentans*). *Sci. Total Environ.* 312, 267–272.
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65, 1074–1081.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W., Zhang, X., 2009. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18, 293–303.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Galloway, T., 2008. Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environ. Toxicol.* 23, 309–318.
- Martinez, E.A., Moore, B.C., Schaumlöffel, J., Dasgupta, N., 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 204–212.
- Martínez-Guitarte, J.L., Planelló, R., Morcillo, G., 2007. Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 147, 590–596.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular function and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- Michailova, P., Petrova, N., Ilkova, J., Bovero, S., Brunetti, S., White, K., Sella, G., 2006. Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Environ. Pollut.* 144, 647–654.
- Ming, J., Xie, J., Xu, P., Liu, W., Ge, X., Liu, B., He, Y., Cheng, Y., Zhou, Q., Pan, L., 2010. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol.* 28, 407–418.
- Morcillo, G., Baretino, D., Carmona, M.J., Carretero, T., Díez, J.L., 1988. Telomeric DNA sequences differentially activated by heat shock in two *Chironomus* subspecies. *Chromosoma* 96, 139–144.
- Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12, 3788–3796.
- Nolen, E.A., Morimoto, R.I., 2002. Chaperoning signalling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809–2816.
- OECD, 2001. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. 218.
- Park, K., Kwak, I.S., 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74, 89–95.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2007. Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373, 113–121.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone-receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71, 1870–1876.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 408, 1598–1603.
- Powers, M.V., Workman, P., 2007. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett.* 581, 3758–3769.
- Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, K.W., Seo, J.S., Ki, J.S., Kim, I.C., Park, H.G., Lee, J.S., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonica* to environmental toxicants. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 104–112.
- Ryan, J.A., Hightower, L.E., 1998. Heat shock proteins: molecular biomarkers of effects. In: Puga, A., Wallale, K.B. (Eds.), *Molecular Biology of the Toxic Response*. Hamilton Printing Co., Castlton, New York, pp. 449–466.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vanderbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Simioncelli, F., Morosi, L., Di Rosa, I., Pascolini, R., Fagotti, A., 2010. Molecular characterization and expression of a heat-shock cognate 70 (Hsc70) and a heat-shock protein 70 (Hsp70) cDNAs in *Rana (Pelophylax) lessonae* embryos. *Comp. Biochem. Physiol. A* 156, 552–560.
- Sinha, A.K., Vanparys, C., De Boeck, G., Kestemont, P., Wang, N., Phuong, N.T., Scippo, M.L., De Coen, W., Robbents, J., 2010. Expression characteristics of potential biomarker genes in Tra catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, exposed to trichlorfon. *Comp. Biochem. Physiol. D* 5, 207–216.
- Snell, T.W., Brogdon, S.E., Morgan, M.B., 2003. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 12, 475–483.
- Sonoda, S., Fukumoto, K., Izumi, Y., Yoshida, H., Tsumuki, H., 2006. Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62, 36–47.
- Su, X., Du, L., Li, Y., Li, Y., Zhou, J., Li, T., 2010. Cloning and expression of the HSP70 gene of sipuncula *Phascolosoma esculenta*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 461–466.
- Waagner, D., Heckmann, L.H., Malmendal, A., Nielsen, N.C., Holmstrup, M., Bayley, M., 2010. Hsp70 expression and metabolite composition in response to short-term thermal changes in *Folsomia candida* (Collembola). *Comp. Biochem. Physiol. A* 157, 177–183.
- Yoshimi, T., Minowa, K., Karouna-Renier, N.K., Watanabe, C., Sugaya, Y., Miura, T., 2002. Activation of stress-induced gene by insecticides in the midge *Chironomus yoshimatsui*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 10–17.
- Young, J.C., 2010. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem. Cell Biol.* 88, 291–300.
- Zhang, Q., Denlinger, D.L., 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapauses in the corn earworm. *J. Insect Physiol.* 56, 138–150.





Contents lists available at ScienceDirect

## Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)

## Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes

Rosario Planelló<sup>1</sup>, Oscar Herrero<sup>1</sup>, José Luis Martínez-Guitarte, Gloria Morcillo\*

Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 April 2011

Received in revised form 11 May 2011

Accepted 13 May 2011

## Keywords:

Hsp70

Hsc70

Ecdysone receptor

Ultraespiracle

Ribosomal genes

Endocrine disruptors

## ABSTRACT

In this work, the effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), two of the most extensively used phthalates, were studied in *Chironomus riparius* under acute short-term treatments, to compare their relative toxicities and identify genes sensitive to exposure. The ecotoxicity of these phthalates was assessed by analysis of the alterations in gene expression profiles of selected inducible and constitutive genes related to the endocrine system, the cellular stress response and the ribosomal machinery. Fourth instar larvae, a model system in aquatic toxicology, were experimentally exposed to five increasing concentrations (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/L) of DEHP and BBP for 24 h. Gene expression was analysed by the changes in levels of transcripts, using RT-PCR techniques with specific gene probes. The exposures to DEHP or BBP were able to rapidly induce the *hsp70* gene in a concentration-dependent manner, whereas the cognate form *hsc70* was not altered by either of these chemicals. Transcription of ribosomal RNA as a measure of cell viability, quantified by the levels of *ITS2*, was not affected by DEHP, but was slightly, yet significantly, downregulated by BBP at the highest concentrations tested. Finally, as these phthalates are classified as endocrine disruptor chemicals (EDCs), their potential effect on the ecdysone endocrine system was studied by analysing the two genes, *EcR* and *usp*, of the heterodimeric ecdysone receptor complex. It was found that BBP provoked the overexpression of the *EcR* gene, with significant increases from exposures of 0.1 mg/L and above, while DEHP significantly decreased the activity of this gene at the highest concentration. These data are relevant as they show for the first time the ability of phthalates to interfere with endocrine marker genes in invertebrates, demonstrating their potential capacity to alter the ecdysone signalling pathway. Overall, the study clearly shows a differential gene-toxin interaction for these two phthalates and adds novel genomic tools for biomonitoring environmental xenobiotics in insects.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Phthalates, diesters of benzenedicarboxylic acid, are a family of man-made chemicals typically used as plasticizers to increase the flexibility and durability of plastic polymers, mainly in polyvinylchloride (PVC) products. Phthalates are also used as solvents, lubricants and fixatives in a huge variety of industrial products, such as cosmetics, detergents, building materials, insecticides, pharmaceuticals and medical devices. Their high production, global consumption and widespread use in consumer products, mean that human and wildlife exposures to phthalates are vir-

tually unavoidable (Schettler, 2006). These compounds are listed as priority substances in the European Union and are, therefore, subjected to an environmental risk assessment (ERA). Phthalates are suspected of possessing endocrine disrupting activity (Latini, 2005) and most of them are included in the European Catalogue of Endocrine Disrupting Compounds (EU-EDC website).

The adverse effects observed in rodent models raised concerns as to whether or not exposure to phthalates represents a potential health risk to humans (Howdeshell et al., 2008). At present, it has been shown that di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-*n*-butyl phthalate (DBP), and butyl benzyl phthalate (BBP) produce reproductive and developmental toxicities (Lyche et al., 2009). The adverse consequences due to phthalates depend upon the dose and timing of exposure. In laboratory animals, exposures to high concentrations were shown to induce liver and kidney injury, cancer, malformations and fetal death. In humans, particular concerns

\* Corresponding author. Tel.: +34 913987328; fax: +34 913987628.

E-mail address: [gmorcillo@ccia.uned.es](mailto:gmorcillo@ccia.uned.es) (G. Morcillo).<sup>1</sup> These authors contributed equally to this paper.

have been raised regarding adverse effects following exposure to phthalates during development. Phthalates are able to cross from maternal blood, via placenta or breast milk, reaching the fetus and neonates, affecting the developing endocrine system, which is essential for diverse biological functions, including sexual development and reproductive functions in adults (Latini, 2005). The high sensitivity of the early developmental stages for endocrine disruption has led to the hypothesis that increased incidence of human reproductive deficits may be produced by exposure to environmental chemicals during fetal and prepubertal life (Sharp and Irvine, 2004). The European Union has banned the use of DEHP (EU, 2008), DBP and BBP in children's products, and California and Canada have restricted their use. However, there is still some controversy regarding the causal links between exposure to EDCs and adverse human health effects (NRC, 2008).

Phthalates can be found at measurable concentrations in aquatic ecosystems throughout the world, due to their high volumes of production and almost continuous release into the environment (Oehlmann et al., 2008). As additive plasticizers, they are not covalently bound to the polymers and, therefore, they can leak out into the surrounding environment. Several recent studies have documented their constant environmental presence in river waters, sediments and home dust (Yuwatinni et al., 2006; Abb et al., 2009). DEHP is often found in freshwater systems and, because of its widespread use, dominated the phthalate concentrations evaluated (up to 8.44 mg/kg in sediments and 154 mg/kg in sewage sludge) in water samples from Germany (Fromme et al., 2002), with local PEC up to 219 µg/L in waters and up to 2045 mg/kg in sediments (EU, 2008). According to the half-life obtained experimentally, abiotic degradability for these two phthalates was 58–480 d for BBP and 390–1600 d for DEHP under sunlight irradiation, via photolysis plus hydrolysis (Lertsirisopon et al., 2009). Bioaccumulation of phthalates has been found in aquatic organisms, while the highest BCF values have been observed in invertebrates (EU, 2008).

Despite the recent increase in research on the ecotoxicity of phthalates, ecotoxicological studies in aquatic wildlife invertebrates and, particularly, benthic biota are limited and highly scarce in comparison to the research into human risks. Chironomid larvae are one of the most ubiquitous freshwater benthic invertebrates, and are abundant and ecologically relevant to the aquatic food chain. As they live in the sediments and feed on sediment particles, they are directly exposed to toxicants. Sediments are the ultimate repository of anthropogenic contaminants entering into water resources and the likely final sink of phthalates, which are generally insoluble in water (Petrovic et al., 2001). The midge *Chironomus riparius* is widely used as test organism in environmental toxicology (EPA, 1996; OECD, 2001). The study of the taxonomic composition of chironomid larvae and the percentage of occurrence of deformities in mouthparts, mainly in the mentum, are used in biomonitoring programmes to obtain information on the levels of organic and chemical pollutions of aquatic ecosystems (Martínez et al., 2003). *Chironomus* has recently been selected as a reference organism for investigations of the potential endocrine disrupting effects of chemicals (OECD, 2006; Taenzler et al., 2007). It was also chosen as the model species for a European IDEA project to evaluate the endocrine disrupting effects in aquatic invertebrates (Segner et al., 2003). To date, most studies carried out in *Chironomidae* regarding the effects of EDCs have mainly focused on developmental or reproductive alterations. Mouthpart deformities have been found in contaminated sediments, and have been associated with physiological alterations induced by these chemicals during moulting, causing mandibular deformities and asymmetries (Watts et al., 2003; Servia et al., 2006; Park and Kwak, 2008a). Delays in emergence, changes in the length of the life cycle and in the sex ratio are other effects associated with EDC treatment (Watts et al., 2001). Research into molecular parameters is an important

approach, because these parameters could be used as biomarkers in larger-scale tests for the toxicological evaluation of these chemicals. Chironomids are increasingly being used for toxicity testing, using molecular biomarkers such as enzyme and gene activity, even though DNA sequence information in these species is still scarce (Gopalakrishnan Nair et al., 2011). The objective of this study was to analyse the early effects of two of the most extensively used phthalates catalogued as EDCs, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and benzyl butyl phthalate (BBP), at the level of gene activity in the aquatic larvae of *C. riparius*. Our study focused on the transcriptional profile of selected genes related to the endocrine system (the ecdysone receptor complex), the cellular stress response (the 70-kDa HS-family) and the protein production machinery (ribosomal RNA). The study had two aims: firstly, to attempt to identify suitable genes related to endocrine disrupting activity, in order to develop a screening system for ecotoxicity monitoring of EDCs and, secondly, to find out whether or not these two related compounds, generally assumed to have similar effects, elicit a similar cellular response. The identification and validation of possible marker genes are gaining acceptance, because they can provide a fast, sensitive and high throughput assay to test compounds improving, at the same time, our understanding of the molecular mechanism underlying toxicity and the mode of action of xenobiotics.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and treatments

The experimental animals were the aquatic larvae from the midge *C. riparius*. Stock cultures are maintained in the laboratory of Biology and Environmental Toxicology (UNED) from natural populations of midge larvae originally collected in a non-polluted area of Valencia (Spain). Larvae were reared under standard laboratory conditions, according to toxicity testing guidelines (US-EPA, 1996; OECD, 2001). They were grown from egg masses in aqueous culture medium (0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.025 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.01 mM FeCl<sub>3</sub>) supplemented with nettle leaves, commercial fish food, and cellulose tissue in polyethylene tanks (500 mL). Cultures were maintained under constant aeration at 20 °C and under standard light–dark periods (16L:8D). For experimental treatments, fourth instar larvae, 10–15 days old, were exposed to the chemicals diluted in culture medium for 24 h with constant aeration at 20 °C in glass recipients. No food or substrate was provided during exposure. Dose selection was based on the results from previous studies in environmental samples (Petrovic et al., 2001; Fromme et al., 2002; Ogunfokan et al., 2006; EU, 2008). The larvae were submitted to butyl benzyl phthalate (BBP) (Aldrich) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Sigma) for 24 h at 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/L, in all cases nominal concentration. Ethanol was used as solvent. Three independent experiments were carried out in each concentration for each phthalate, using 10 larvae arising from three different egg masses (same age or days after hatching), and each sample consisted of at least three replicates ( $n=9$ ). The control larvae used in each case were exposed to the same concentration of solvent as the corresponding treatment and were also measured in triplicate. Larvae were stored at –80 °C until RNA isolation was carried out.

### 2.2. Survival test

For the acute toxicity test, three independent experiments were carried out in which groups of 15 larvae proceeding from three different egg masses were randomly mixed and exposed to the five selected concentrations of BBP and DEHP. After a 24-h exposure, the number of dead individuals was determined and compared to control groups.



### 2.3. RNA isolation

Total RNA was extracted from control and exposed fourth instar larvae (ten animals for each experiment) using a guanidine isothiocyanate based method, performed with a commercial kit (Trizol, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, frozen larvae were homogenized in one volume of Trizol and left for 5 min at room temperature. Then, 0.2 volumes of chloroform were added to each sample, mixed and left for 5 min at room temperature. Subsequently, the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and 15,000 × g. Following transfer of the aqueous phase, the RNA was finally recovered by isopropyl alcohol precipitation (0.5, v/v), washed with 70% ethanol, and resuspended in DEPC water. DNase treatment using 1 µL RNase-free DNase (Roche) per 50 µL sample was carried out, with subsequent phenol/chloroform extractions. The quality and quantity of total RNA were determined by agarose electrophoresis and absorbance spectrophotometry (Biophotometer Eppendorf), and purified RNA was finally stored at –20 °C.

### 2.4. Reverse transcription

After checking RNA integrity in 1.5% agarose gels, reverse transcription was undertaken using 1 µg of total RNA. Either an oligo dT primer (Invitrogen) or random hexamers (Invitrogen) were used with M-MLV enzyme (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The cDNAs obtained were stored at –20 °C until used as templates for PCRs.

### 2.5. Polymerase chain reaction (PCR)

Multiplex reactions were carried out using gene-specific primers, with actin as reference gene. *Actin*, *hsp70* and *EcR* gene primers are described in Martínez-Guitarte et al. (2007), Planelló et al. (2008) and Morales et al. (2011). Gene-specific primers for *hsc70* and *usp* were designed from DNA sequences present in databases, following a search in the FASTA invertebrate database to detect conserved regions. The *hsc70* sequence from *Chironomus yoshimatsui* (accession # AF448434) was compared with sequences from *Chironomus tentans* (AF448433), *Ceratitis capitata* (U20256), *Drosophila melanogaster* (AY084193), *Manduca sexta* (AF194819), *Locusta migratoria* (AY299637), *Bombyx mori* (AB084922), *Chilo suppressalis* (AB206478), *Trichoplusia* spp. (DQ845103), *Cotesia rubecula* (AY150371) and *Mamestra brassicae* (AB251896) and a highly conserved region was defined and used to design a set of primers. The *usp* sequence from *C. tentans* (accession # AF045891) was compared with sequences from *Aedes aegypti* (AF305213), *D. melanogaster* (NM.057433), *Tribolium castaneum* (XM.970162), *Leptinotarsa decemlineata* (AB211193), *Xenos peckii* (AY8271559) and *L. migratoria* (AY348873) and primers were obtained from highly conserved regions. The rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) primers were designed from *Chironomus thummi* DNA sequence present in the databases (accession # AJ296807). The primers were designed to produce different-sized PCR products to allow simultaneous multiplex analysis with actin as inner control. The amplification of ITS2 fragment was carried out with 26s as internal control. Sequences and fragment size of each gene-specific pair of primers are shown in Table 1. *C. riparius* gene fragments were cloned and sequenced to ensure that they matched the selected genes.

PCR was performed in 20 µL with 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Biotools, Spain), 0.4 µM of each primer and 0.2 u of Taq polymerase (Biotools, Spain) under the following conditions: denaturation for 30 s, annealing for 30 s and elongation for 40 s. A MiniOpticon Thermocycler (Bio-Rad) was used. After several trials to ensure log-phase amplification, 28 cycles were carried out, with an annealing

**Table 1**

Primers used and fragment sizes obtained in PCRs.

Gene	Primer	Fragment size
EcR forward	5'-AGACGGTTATGAACAGCC-3'	240 bp
EcR reverse	5'-CGAGCCATGCGCAACATC-3'	
Usp forward	5'-CCGCCCAATCATCC-3'	121 bp
Usp reverse	5'-CTGTGCGTTTGAAGAATCC-3'	
Hsp70 forward	5'-CATGTGACGACGCAAGAGA-3'	274 bp
Hsp70 reverse	5'-TTGCCACAGAAATCTTG-3'	
Hsc70 forward	5'-CGTGCTATGACTAAGGACAA-3'	239 bp
Hsc70 reverse	5'-GCTTCATTGACCATAGCTTC-3'	
Actin forward	5'-GATGAAGATCTCACCAGAACG-3'	201 bp
Actin reverse 2	5'-CGGAACGTTCAATTACCG-3'	
ITS2 forward	5'-TCATCAAGCCGTTGTCT-3'	243 bp
ITS2 reverse	5'-AATCGAATTGCAACACC-3'	
26s forward	5'-TTCGGACCTCACTCATGT-3'	220 bp
26s reverse	5'-CCGCATTCAAGCTGGACTTA-3'	

temperature of 52 °C to amplify the fragments corresponding to *EcR* and 54 °C for *usp*, *Hsp70* and *Hsc70* and ITS2. The amplified PCR products were run in a 9% acrylamide gel at 60 V for 3 h in 1 × TGE buffer (40 mM Tris–Cl (pH 8.5), 200 mM glycine, and 2.5 mM EDTA), visualized after ethidium bromide staining and quantified with Chemigenius3 (Syngene), using GeneSnap 6.05 and GeneTools 3.06 software. Values of density across the whole bands were normalized against the actin or 26s standards, and the relative expression levels were then calculated. The level of expression in non-exposed control larvae was considered as background level or 1. To verify reproducibility, the analysis was repeated three times in independent experiments, with three replicates for each sample. The data were statistically analysed using SPSS software 19. The significant differences between groups were determined using the analysis of variance (ANOVA), with the Games–Howell procedure as the post hoc test. A 95% significance level ( $p < 0.05$ ) was established for all statistical analyses carried out.

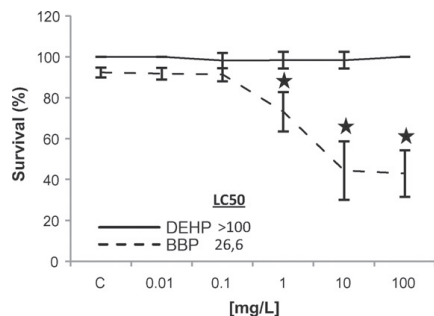
## 3. Results

### 3.1. Effects of BBP and DEHP on larval survival

Larval mortality was not found under any of the 24 h DEHP exposures (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/L), reaching 100% survival even at the highest concentration tested, although the larvae appeared to be affected, with a decrease in mobility and loss of colour. At the same concentrations and time intervals, BBP treatments were more toxic to the fourth instar larvae, reaching a significant mortality at the highest concentration tested (100 mg/L) (Fig. 1).

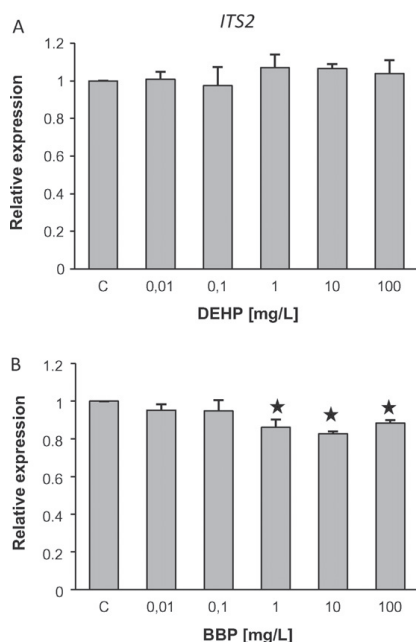
### 3.2. Effects of BBP and DEHP on ribosomal DNA transcription

Ribosomal genes are considered as housekeeping genes; their transcription products are essential for cellular maintenance as they constitute the ribosome, the machinery for the synthesis of all cellular proteins. Ribosomes are basic for cellular viability; therefore, analysis of ribosomal gene transcription was selected as a measure of cell injury provoked by the exposure to the chemicals. Ribosomal transcription represents over 80% of total transcriptional activity in cells, with the rRNAs being highly abundant and stable. To evaluate the changes in the transcription profile, it is necessary to differentiate between the newly synthesized rRNA and the bulk of mature 28s, 18s and 5.8s rRNAs. To this end, alterations in rDNA gene expression were evaluated by analysing the levels of recent transcripts by RT-PCR, using a probe to the internal transcribed spacer 2 (ITS2) (Gorab et al., 1995). ITS2 is present in the first immature transcription product of the rDNA gene and absent in the mature processed 28s and 18s rRNAs. As shown in Fig. 2A, when

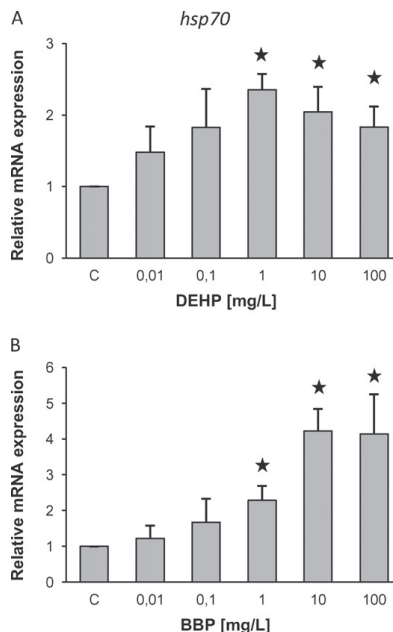


**Fig. 1.** Dose-dependent effect of BBP and DEHP treatments on the survival of fourth instar *Chironomus riparius* larvae. The values represent mean and SE from data obtained in three independent experiments. \*Significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Median lethal concentration (LC50) was derived through Probit analysis. Twenty-four hour LC50 was estimated as 26.6 mg for BBP and >100 mg for DEHP.

compared to controls, the different DEHP treatments (24 h–0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/L) did not alter the levels of the ribosomal precursor in any of the concentrations assayed. For BBP at the same concentrations and time exposures, the results showed that ribosomal transcription was not affected at the lower concentrations, but a slight, yet significant, decrease (around 15% inhibition at 1 mg/L)



**Fig. 2.** Effect of (A) DEHP and (B) BBP treatments (24 h) on rDNA transcription in *C. riparius* larvae. Levels of newly synthesized rRNA were obtained by RT-PCR using primers to the internal transcribed spacer 2 (ITS2). Values were normalized relative to 26S rRNA transcript levels and shown as mean  $\pm$  SE of three independent experiments, each with three replicates. Data are presented as fold change relative to the transcript expression in the control group. \*Significant difference ( $p < 0.05$ ) as compared to control cultures.



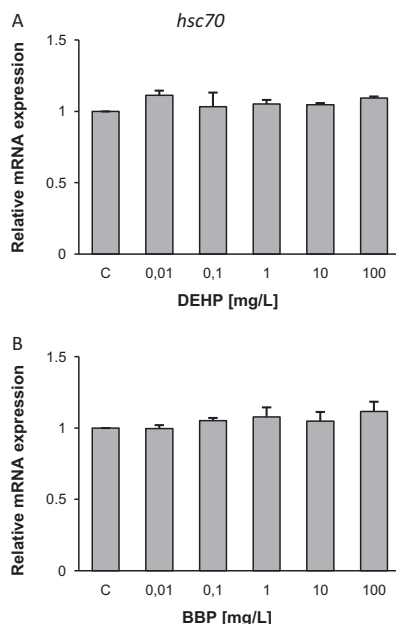
**Fig. 3.** Changes in the expression of the *hsp70* gene after 24-h treatments with (A) DEHP and (B) BBP in *C. riparius* larvae. The mRNA level values were calculated relative to *actin* gene expression. Each bar is the mean  $\pm$  SE obtained from three independent experiments, each with three replicates. Values are expressed as fold changes with respect to the control. \*Significant difference ( $p < 0.05$ ) as compared to control cultures.

in the levels of immature rRNA (still containing ITS2) was provoked by exposure to BBP at the higher concentrations tested, from 1 mg/L and above (Fig. 2B). Therefore, BBP exposures were more toxic to the fourth instar larvae than were DEHP exposures, as measured by the impairment of rDNA gene activity, which could lead to potential cell injury.

### 3.3. Effects of BBP and DEHP exposures on the expression of the 70-kDa heat-shock gene family

The 70-kDa heat-shock protein family is an ancient and conserved group of proteins present in all species and every cell type analysed to date, and plays a basic role in cells as molecular chaperones. The family includes the cognate proteins (HSC70), highly abundant in normal cellular conditions, as well as inducible members (HSP70) present in stressed conditions provoked by a broad spectrum of physical and chemical insults. To analyse if BBP and DEHP have effects on the expression of the *hsp70* and *hsc70* genes encoding for these proteins, the levels of their respective mRNA were measured by RT-PCR using specific probes in exposed fourth instar larvae and, then, compared to those measured in the corresponding control groups of untreated larvae exposed to the solvent. As shown in Fig. 3, exposures to DEHP or BBP for 24 h were able to induce the *hsp70* gene in a concentration-dependent manner, with significant increases of up to twofold above control levels in the case of DEHP and fourfold for BBP, at the highest concentrations tested. In contrast, analysis of the expression of the constitutive *hsc70* gene showed that DEHP or BBP exposures did not affect the mRNA levels, which remained similar to those found in untreated



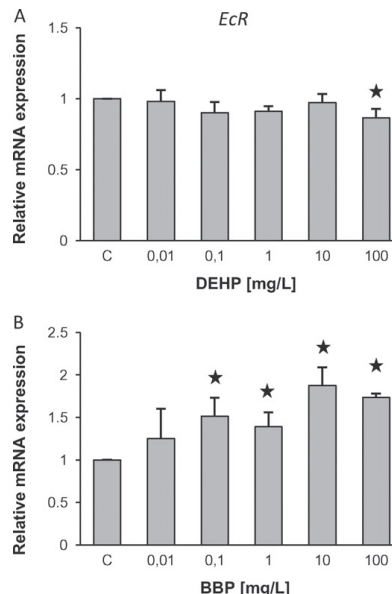


**Fig. 4.** RT-PCR of *C. riparius hsc70* expression after 24-h treatments with (A) DEHP and (B) BBP. The *hsc70* mRNA expression level values were calculated relative to *actin* gene expression and shown as mean  $\pm$  SE of three independent experiments, each with three replicates. No significant differences from the control larvae ( $p \leq 0.05$ ).

control groups of larvae for all the concentrations assayed (Fig. 4).

### 3.4. Effects of BBP and DEHP on the expression profiles of the ecdysone receptor genes

Two main hormones, ecdysone and the juvenile hormone, control the development of insects. Ecdysone, produced by the prothoracic gland, has a direct influence on insect moulting and metamorphosis. The ecdysone action inside the insect cell is mediated through the interaction with the ecdysone receptor, a heterodimer comprised of two elements: the ecdysone receptor (*EcR*) and the ultraspiracle (*USP*). The genes, *EcR* and *usp*, coding for these two proteins were selected to evaluate if the phthalates can alter the activity of specific endocrine-related genes. RT-PCR analysis was used to evaluate the levels of the transcripts of these genes, after 24-h exposures at the five different concentrations of BBP and DEHP selected in this study. Following normalization to avoid random effects on sampling data, the expression of mRNA was analysed in multiplex RT-PCR in relation to *actin* mRNA levels. In each case, gene expression patterns were compared to those obtained from control cultures exposed to the same concentration of solvents. To avoid differences being caused by experimental procedures or those intrinsic to the larvae being sampled, for each condition, three independent experiments from different cultures, as well as three replicates, were carried out. As shown in Fig. 5, BBP treatments provoked a clear increase in the level of *EcR* mRNA when compared to control untreated larvae, with significant overexpression of the *EcR* gene from exposures of 0.1 mg/L and above. On the contrary, DEHP treatments (Fig. 5A) provoked a slight decrease, statistically significant at the highest dose tested.

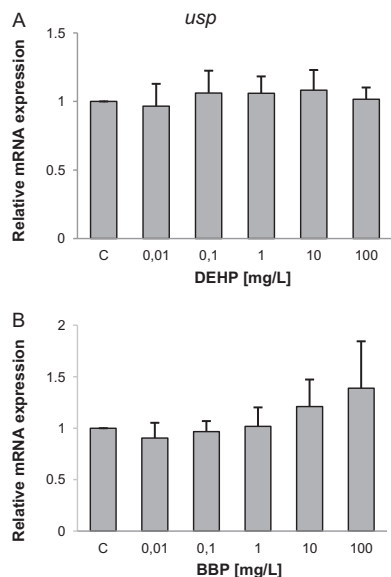


**Fig. 5.** Relative expression of the *EcR* gene under control and 24-h (A) DEHP and (B) BBP treatments in *C. riparius* larvae. RT-PCR experiments were carried out with the primers listed in Section 2. Transcript levels were normalized against *actin* gene expression and presented in relation to the values for the non-exposed control larvae. The mean  $\pm$  SE are shown of measurements taken in three independent biological samples, each with three replicates. Densitometric values were normalized using those for *actin* mRNA and represented in relation to the values for control larvae. \*Significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

In the case of the *usp* gene, in contrast to that found for its partner *EcR*, expression levels remained unaffected in all the different DEHP and BBP concentrations tested (Fig. 6A and B), although a slight increase, not statistically significant, was observed at the higher BBP treatments. These results provide the first demonstration of PE-induced alterations of the ecdysone signalling pathway in arthropoda.

## 4. Discussion

Gene expression analysis is being increasingly used in the diagnosis of environmental contamination, as it might be more sensitive and is less time-consuming than conventional toxicology endpoints. In addition, it offers mechanistic values and provides a more comprehensive insight into toxicity (Ankley et al., 2006; Steinberg et al., 2008). The present study was designed to compare the effects of DEHP and BBP, two of the most extensively used phthalates, in the aquatic larvae of *C. riparius* at the cellular level. Acute short exposures were selected, in the range 0.01–100 mg/L for both chemicals, aimed to detect the early responses to and/or primary effects of these chemicals not derived from complex cellular toxicity processes. By monitoring the expression profile of different model genes, we found rapid genomics effects of these environmental contaminants in the three different gene families analysed: stress-related genes (*hsp70*/*hsc70*), hormonal-related genes (*EcR* and *usp*) and housekeeping genes (*rDNA*). Notable differences were found, not only in the response of the different genes to these phthalates but also among the distinct phthalates, in their ability to alter a particular gene. This is discussed below and compared with the information available from other experimental systems,



**Fig. 6.** *usp* mRNA levels in fourth instar midge larvae exposed to (A) DEHP and (B) BBP treatments. Densitometric analysis of *usp* mRNA values was normalized against actin and presented in relation to the values for the non-exposed control larvae. Means and standard error are shown from three independent experiments, each with three different samples. No significant differences from the control larvae ( $p \leq 0.05$ ).

mainly vertebrates, where most research on the cellular effects of phthalates has been carried out.

DEHP, BBP and DBP are the most frequently studied phthalates, and they were found to produce almost identical responses in rodent models, with a relative toxic potency of DEHP > DBP > BBP (Foster, 2005). In contrast, BBP was found to be more toxic than DEHP in *C. riparius*, as shown by the larval survival test at the times and concentrations assayed. Moreover, BBP at concentrations of 1 mg/L and above provoked a significant inhibition in ribosomal gene transcription, while in the case of DEHP it was not affected even at the highest doses tested. It is tempting to speculate that the inhibitory effect of BBP on ribosomal gene activity could be correlated with the higher larval mortality rates provoked by this compound. As ribosomal transcription is essential for ribosomal production, and ribosomes are essential for the synthesis of all the cellular proteins, depletion in cellular proteins in our study led to cellular failure. Ribosome biogenesis is a major cellular undertaking, and is a diagnostic indicator for the general metabolism of the cell. Indeed, almost any disturbance that slows down cell growth or protein synthesis, such as nutrient or growth factor starvation, senescence, toxic lesion, viral infections, leads to decrease in rDNA transcription (Grummt, 2010). In *Chironomus*, cadmium exposure, but not that of bisphenol A, inhibited transcription of ribosomal genes (Planelló et al., 2007, 2008).

The cellular response to stress is characterized by the activation of a set of genes to counteract the physiological disturbance induced by physical or chemical agents. Among these genes, the 70-kDa heat-shock gene family appears extraordinarily well conserved throughout evolution from bacteria to man, encoding proteins that may be responsible for survival and adaptation under heat-shock

conditions, and also during xenobiotic exposure of cells (Gupta et al., 2010). In this study, following different exposures to BBP and DEHP, remarkable differences were found in the transcriptional response of heat-shock protein 70 gene and heat-shock cognate protein 70 gene (*hsp70/hsc70*) in *C. riparius*. Both phthalates exert upregulatory effects on the *hsp70* gene, following a concentration–response relationship, with BBP being a stronger inducer (up to fourfold increase). However, neither phthalate, at any of the concentrations tested, altered the counterpart *hsc70* constitutively expressed under control conditions, whose levels of mRNA remained nearly identical to those found in the corresponding control samples. These results suggest that the *hsc70* gene seems to have a robust resistance to the effects of these toxicants, and appears to be differentially regulated than *hsp70*. Nevertheless, other authors have reported that *hsc70* is activated as well as *hsp70* under exposure to different metals and pollutants in *C. tentans* (Karouna-Renier and Zehr, 2003; Lee et al., 2006; Karouna-Renier and Rao, 2009). Our results indicating that the stress gene *hsp70* could be a sensitive molecular biomarker for these phthalates are an addition to the growing body of literature that connects the HSP70 protein to different chemical stressors. A number of recent studies have shown the potential of these genes in pollution monitoring. The inducible form of the *hsp70* gene from the midge *Chironomus* has been described as being activated by different environmental toxicants, including pesticides (Yoshimi et al., 2002), metals (Karouna-Renier and Rao, 2009; Planelló et al., 2010) and bisphenol A (Planelló et al., 2008). Currently, the potential use of heat-shock proteins for predicting the toxicity of chemicals is being actively investigated (Gupta et al., 2010). Although HSP70 is a defence protein, often mentioned as a broad range sensor of cellular stress, it is worth pointing out that other compounds, such as pentachlorophenol and tributyltin, are unable to activate this gene even though they are potent biocides (Morales et al., 2011). The induction patterns of different heat-shock genes exhibit variations based on the type of inducer, and are potentially useful as biomarkers of early cellular stress-sensing events provoked by a particular chemical. Genes encoding for other stress-related proteins, such as HSP90 and HSP40, were also found to be activated by DEHP in *Chironomus* (Park and Kwak, 2008a), while other stress genes, such as *hsp16.1* and *hsp16.2*, were found to be down-regulated by DEHP in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Roth et al., 2007). Apart from heat-shock genes, other genes have been reported to be altered by DEHP, such as the haemoglobin genes in *C. tentans* (Lee et al., 2006) and serine-type endopeptidase and alcohol dehydrogenase genes in *C. riparius* (Park and Kwak, 2008b, 2009).

Experimental evidence for adverse effects on reproduction and development has identified phthalates as endocrine active chemicals in humans and also in mammalian models (Lyche et al., 2009). Although there have been a number of studies examining the effects of phthalates on steroid hormones, mainly androgens and estrogens, there is limited information on the direct effects of these compounds on invertebrate hormones and, up to now, no information available about interactions with insect ecdysteroid hormones. In this study, the effects of DEHP and BBP on hormonal endpoints have been assessed by measuring the potential effect on the activity of the genes coding for the hormone ecdysone receptor in *C. riparius* larvae. In insects, development of both larval and imaginal tissues is controlled by the steroid hormone ecdysone that triggers the changes that result in metamorphosis. Ecdysone responsiveness of cells is mediated by two members of the superfamily of hormone nuclear receptors: ecdysone receptor EcR and ultraspiracle USP. The functional complex is a heterodimer EcR–USP (Lezzi et al., 1999, for a review) that, once activated by the hormone, becomes a transcription factor acting as a molecular switch, which turns on the gene programmes that allow developmental changes and

lead to the progression of moulting and metamorphosis. Our data revealed that BBP, but not DEHP, is able to upregulate the expression of the *Ecr* gene, while neither of them alters the expression of the *usp* gene. In contrast, DEHP displayed a tendency to decrease the activity of this *Ecr* gene, which was statistically significant at the highest concentration. These results clearly show that each phthalate had a differential selectivity for the ecdysone receptor gene *Ecr*. As the nuclear receptor is a key factor in hormone signal transduction inside the cells, our results provide the first evidence that phthalates are able to directly interact at the cellular level with the insect endocrine pathway. *Ecr* is induced directly by ecdysone, and provides an autoregulatory loop that increases the level of the receptor protein in response to the hormone ligand (Koelle et al., 1991). Therefore, our data demonstrate that BBP has an ecdysone-mimetic action and is able to upregulate the levels of *Ecr* in *C. riparius* cells, whereas DEHP might act as an antagonist. In contrast to that found for its functional partner, *usp* gene expression was not affected by the presence of the phthalates at the time and concentrations tested. Although this differential behaviour could, at first sight, be surprising it does resemble the effect of the natural hormone ecdysone, which increases *Ecr* concentrations. In contrast, USP (constitutively expressed) remains constant, although phosphorylation is enhanced (Yao et al., 1993; Rauch et al., 1998). Interestingly, the effects of BBP on the hormone receptor gene are in agreement with those previously reported in *C. riparius* for other well-known endocrine disruptors, such as bisphenol A and cadmium, which also upregulated the *Ecr* gene (Planelló et al., 2008, 2010) differing from the behaviour found for DEHP. Our results reinforce the potential of this gene to be assayed as a biomarker for the assessment of EDCs in aquatic insects, and suggest a possible mechanism for the role of endocrine disruptors in invertebrates. It is worth mentioning that the estrogen-related receptor (ERR), a member of the orphan nuclear-receptor family, appeared also activated in the presence of BPA, nonylphenol and DEHP (Park and Kwak, 2010).

Although the endocrine systems of invertebrates differ drastically from those of vertebrates, it is of interest to note that the ecdysteroid hormones in insects belong to the family of steroid hormones. Moreover, the ecdysone receptor belongs to the superfamily of nuclear hormone receptors that includes estrogens, androgens, thyroid hormone, retinoic acid and glucocorticoid receptors, among others. Several studies have demonstrated that some phthalates are capable of interacting with estrogen receptors (ERs) and induce ER-mediated responses (Jobling et al., 1995). It has been reported that BBP binds to ER $\alpha$  and enhances the transcriptional activity of ER $\alpha$  (Fujita et al., 2003). Our pioneering results in invertebrates are in accordance with experimental evidence in vertebrates, which highlights that the nuclear-receptor superfamily is a molecular target for endocrine disruptors (Diamanti-Kandaris et al., 2009 for review). Interestingly, also the differences we found in relation to *Ecr* between BBP and DEHP have been reported for ER in other experimental systems. *In vitro* assays demonstrated that BBP exhibits an estrogenic effect through estrogen receptor transactivation, whereas DEHP did not elicit any agonistic ER activity (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009). BBP was estrogenic in yeast screen and human breast cancer cells, while DEHP showed no estrogenic activity in these *in vitro* assays (Harris et al., 1997). More recently, a toxicogenomic study of phthalate–gene interactions in humans showed that BBP and DBP interact with estrogen receptor 1, estrogen receptor 2 and androgen receptor genes, while DEHP and MEHP did not, although they did interact with the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR (Singh and Li, 2011). In male zebrafish, exposure to DEHP (5000 mg/kg) increased the levels of two peroxisome proliferator-activated receptor-responsive genes (Uren-Webster et al., 2010). In rodents, DEHP has been reported to inhibit the enzyme aromatase, which converts testosterone to

estradiol and, thereby, plays an important role in sexual differentiation (Andrade et al., 2006). The phthalates discussed here (DEHP and BBP) both interfere with the synthesis of testosterone, as well as with insulin-like growth factor 3 (IGF-3). They are being considered to be anti-androgenic phthalates, whereas their effects on female sexual differentiation have been less studied (Howdeshell et al., 2008).

To sum up, the effects of DEHP and BBP on the expression of genes related to the insect endocrine system do share some similarities with those encountered in the vertebrate estrogenic system. The data obtained in our study provide the first insights into the potential ability of phthalates to have an impact on the gene expression of the ecdysone receptor and, consequently, on the ecdysone-mediated responses in insects. The ecological relevance of these genomic effects, especially the capability to interact with the hormonal system in insects, clearly shown for the first time in our study, merits further research. The potential effects at lower doses, but over longer periods of exposure, should be considered particularly regarding the bioaccumulation of phthalates. Overall, our study improves the knowledge of gene-toxin interactions and adds new genomic endpoints for further monitoring phthalates, as well as other aquatic pollutants, in natural populations under environmentally relevant scenarios (lower concentrations and chronic exposures as well as combined exposures to mixtures of phthalates). Most of the physiological, organismal and population responses to the environment, natural or polluted, have their origin and explanation at the genomic level, by turning genes up and down.

## 5. Conclusions

Chironomids are sentinel organisms in the monitoring of the health of aquatic systems and constitute an attractive model of ecotoxicological relevance for the study of pollutant-induced genomic-level responses. There is little DNA sequence information in *Chironomus*, due to the lack of a genome-sequencing programme. This reinforces the need to identify specific and sensitive genes in these species, to be able to develop screening systems for ecotoxicity monitoring. Our results clearly show that, following DEHP and BBP exposures, rapid and differential changes in gene expression take place in *C. riparius*, among the group of genes that encode proteins belonging to three different metabolic pathways: stress-related (*hsp70/hsc70*), endocrine-related (*Ecr/usp*) and housekeeping genes (*rDNA*). The data suggest that short acute exposures to these phthalates are able to specifically alter the stress response and the ecdysone signalling pathway, and that long-term chronic exposures may alter development and reproduction. Our results show for the first time that hormone-mimicking chemicals in vertebrates, such as phthalates, can also have hormonal activities in invertebrates. Moreover, the results suggest that the behaviour of BBP and DEHP in relation to the steroid hormone ecdysone signalling pathway resembles that of steroid hormones, particularly sex steroids, in vertebrates. Although further research is needed, these findings are of considerable biological relevance. Such research should study the potential of the ecdysone receptor genes, and/or proteins, for assessing interference by endocrine disrupting chemicals in natural ecologically relevant scenarios, and should provide better understanding of endocrine physiology and of the role of invertebrate steroids in these processes.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. José Luis Díez (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) for helpful discussions and Dr. T.

Carretero (University of Zaragoza) and Ted Cater for critical reading of the manuscript. This work was supported by grant CTM-2009-07189 of the Ciencias y Tecnologías Medioambientales, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain.

## References

- Abb, M., Heinrich, T., Sorkau, E., Lorenz, W., 2009. Phthalates in home dust. *Environ. Int.* 35, 965–970.
- Andrade, A.J., Grande, S.W., Talsness, C.E., Grote, K., Chahoud, I., 2006. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227, 185–192.
- Ankley, G.T., Daston, G.P., Degitz, S.J., Denslow, N.D., Hoke, R.A., Kennedy, S.W., Miracle, A.L., Perkins, E.J., Snape, J., Tillitt, D.E., Tyler, C.R., Versteeg, D., 2006. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4055–4065.
- Diamanti-Kandaris, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342.
- EPA, 1996. Chironomid sediment toxicity test, ecological effects tests guidelines. EPA 712-C-96-313, 2nd edition. 2000 EPA 600/R-99/064, Washington, DC, USA.
- EU, 2008. Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Summary Risk Assessment Report. EUR 23384 EN/2. ISSN 1018-5593.
- Foster, P.M., 2005. Impaired fetal Leydig cell function. Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 713–719.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–1438.
- Fujita, T., Kobayashi, Y., Wada, O., Tateishi, Y., Kitada, L., Yamamoto, Y., Takashima, H., Muramaya, A., Yano, A., Baba, T., Kato, S., Kawabe, Y., Yanagisawa, J., 2003. Full activation of estrogen receptor  $\alpha$  activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 26704–26714.
- Chisari, M., Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2009. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* 189, 67–77.
- Gopalakrishnan Nair, P.M., Park, S.Y., Lee, S.-W., Choi, J., 2011. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotropin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 101, 31–37.
- Gorab, E., García de Lacoba, M., Botella, M.L., 1995. Structural constraints in expansion segments from a midge 26S rDNA. *J. Mol. Evol.* 41, 1016–1021.
- Grummt, I., 2010. Wisely chosen paths: regulation of ribosomal RNA synthesis. *FEBS J.* 227, 4626–4639.
- Gupta, S.C., Shrama, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86, 377–384.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105, 802–811.
- Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Gray, L.E., 2008. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague Dawley rat in a cumulative, dose additive manner. *Toxicol. Sci.* 105, 153–165.
- Howdeshell, K.L., Rider, C.V., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2008. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ. Res.* 108, 168–176.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103, 582–587.
- Karouna-Renier, N.K., Zehr, J.P., 2003. Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in the midge larvae (*Chironomus tentans*). *Sci. Total Environ.* 312, 267–272.
- Karouna-Renier, N.K., Rao, K.R., 2009. An inducible HSP70 gene from the midge *Chironomus dilutus*: characterization and transcription profile under environmental stress. *Insect Mol. Biol.* 18, 87–96.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P., Hogness, D.S., 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59–77.
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65, 1074–1081.
- Latini, G., 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin. Chim. Acta* 361, 20–29.
- Lertsirisoopon, R., Soda, S., Sei, K., Ike, M., 2009. Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural sunlight irradiation. *J. Environ. Sci.* 21, 285–289.
- Lezzi, M., Bergman, T., Mouillet, J.F., Henrich, V.C., 1999. The ecdysone receptor puzzle. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 99–106.
- Lyche, J.L., Gutleb, A.C., Bergman, A., Eriksen, G.S., Murk, A.J., Ropstad, E., Saunders, M., Skaare, J.U., 2009. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 12, 225–249.
- Martínez, E.A., Moore, B.C., Schaumlöffel, J., Dasgupta, N., 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 204–212.
- Martínez-Guitarte, J.L., Planelló, R., Morcillo, G., 2007. Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 147, 590–596.
- Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 153, 150–158.
- NRC (National Research Council), 2008. The National Academic of Sciences. Phthalates and Cumulative Risk Assessment. The Task Ahead, ISBN 0-309-12842-0, 208 pp.
- Oehlmann, J., Oetken, M., Schulte-Oehlmann, U., 2008. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environ. Res.* 108, 140–149.
- OECD, 2001. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals, sediment–water chironomid toxicity test using spiked sediment. 218.
- OECD, 2006. Series on testing and assessment. Number 55. Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity test with emphasis in developmental, reproductive and endocrine disruptive effects.
- Ogunfokan, A.O., Torton, N., Adenuga, A.A., Okoh, E.K., 2006. Survey of levels of phthalate ester plasticizers in a sewage lagoon effluent and receiving stream. *Environ. Monit. Assess.* 118, 457–480.
- Park, K., Kwak, I.S., 2008a. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74, 89–95.
- Park, K., Kwak, I.S., 2008b. Expression of *Chironomus riparius* serine-type endopeptidase gene under di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 151, 349–354.
- Park, K., Kwak, I.S., 2009. Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 150, 361–367.
- Park, K., Kwak, I.S., 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79, 934–941.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in fresh water sediments. *Trends Anal. Chem.* 20, 637–648.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2007. Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373, 113–121.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone-receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71, 1870–1876.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 408, 1598–1603.
- Rauch, P., Grebe, M., Elke, C., Spindler, K.D., Spindler-Barth, M., 1998. Ecdysteroid receptor and ultraspiracle from *Chironomus tentans* (Insecta) are phosphoproteins and are regulated differently by molting hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 265–275.
- Roth, J.Y., Jung, I.H., Lee, J.Y., Choi, J., 2007. Toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 237, 126–133.
- Schettler, T., 2006. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.* 29, 134–139.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vanderbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Servia, M.J., Péry, A.R., Heydorff, M., Garric, J., Lagadic, L., 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15, 229–240.
- Sharp, R.M., Irvine, D.S., 2004. How strong is evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *Br. Med. J.* 328, 447–451.
- Singh, S., Li, S.S.L., 2011. Phthalates: toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics* 97, 148–157.
- Steinberg, C.E.W., Stützenbaum, S.R., Menzel, R., 2008. Genes and the environment—striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci. Total Environ.* 400, 142–161.
- Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., Weltje, L., 2007. Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology* 16, 221–230.
- Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M., 2010. Mechanism of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 360–369.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Chronic exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol A—effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55, 113–124.

- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2003. Exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol A—effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 207–215.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., Evans, R.M., 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *ultra-spiracle* genes. *Nature* 366, 476–479.
- Yoshimi, T., Minowa, K., Karouna-Renier, N.K., Watanabe, C., Sugaya, Y., Miura, T., 2002. Activation of stress-induced gene by insecticides in the midge *Chironomus yoshimatsui*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 10–17.
- Yuwatinni, E., Hata, N., Taguchi, S., 2006. Behavior of di(2-ethylhexyl) phthalate discharged from domestic waste water into aquatic environment. *J. Environ. Monit.* 8, 191–196.



## Transcriptional Responses, Metabolic Activity, and Mouthpart Deformities in Natural Populations of *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Environmental Pollutants

Rosario Planelló,<sup>1\*</sup> María J. Servia,<sup>2\*</sup> Pablo Gómez-Sande,<sup>3,4</sup> Óscar Herrero,<sup>1</sup> Fernando Cobo,<sup>3,4</sup> Gloria Morcillo<sup>1</sup>

AQ1  
AQ2

<sup>1</sup>Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15008 A Coruña, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Sur s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup>Estación de Hidrobiología "Encoro do Con," Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra, Spain

Received 30 October 2012; revised 24 June 2013; accepted 26 June 2013

AQ3

**ABSTRACT:** Biomarkers are an important tool in laboratory assays that link exposure or effect of specific toxicants to key molecular and cellular events, but they have not been widely used in invertebrate populations exposed to complex mixtures of environmental contaminants in their natural habitats. The present study focused on a battery of biomarkers and their comparative analysis in natural populations of the benthic larvae of *Chironomus riparius* (Diptera), sampled in three differentially polluted rivers (the Con, Sar, and Louro in Galicia, Spain). In our study, some parameters were identified, such as *hsp70* gene activity, GST enzymatic activity, total glycogen content and mouthpart deformities, which showed significant differences among populations from the three rivers that differed in the levels and types of sedimentary contaminants analyzed (metals, organic-chlorine pesticides, alkylphenols, pharmaceutical, and personal care products). In contrast to these sensitive biomarkers, other parameters showed no significant differences (*hsc70* gene, *EcR* gene, *P450* gene, RNA:DNA ratio, total protein content), and were stable even when comparing field and nonexposed laboratory populations. The *hsp70* gene seems to be particularly sensitive to conditions of pollutant exposure, while its constitutive counterpart *hsc70* showed invariable expression, suggesting that the *hsc70*/*hsp70* ratio may be a potential indicator of polluted environments. Although further studies are required to understand the correlation between molecular responses and the ecological effects of pollutants on natural populations, the results provide new data about the biological responses to multiple-stressor environments. This field study adds new molecular

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Dr. R. Planelló; e-mail: rplanello@ccia.uned.es

\*These authors contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: Ciencias y Tecnologías Medioambientales, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain..

Contract grant number: CTM-2009-07189.

Contract grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain.

Contract grant number: CGL2009-10868.

Published online 0 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/tox.21893

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

1



## 2 PLANELLÓ ET AL.

endpoints, including gene expression, as suitable tools that, complementing other ecotoxicological parameters, may help to improve the methodologies of freshwater monitoring under the increasing burden of xenobiotics. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol 00: 000–000, 2013.

**Keywords:** Hsp70; Hsc70; EcR; Cyp450; GST; glycogen; mentum deformities; biomarkers; environmental monitoring; ecotoxicology

## INTRODUCTION

The potentially adverse effects on wildlife of the increasing number of anthropogenic chemicals released into the environment have become a serious issue. In addition to concerns about exposure to individual substances, there is growing awareness about the importance of mixtures of several chemicals, as actually found in polluted freshwaters. One of the challenges facing environmental toxicologists is to understand the biological responses of organisms living in natural aquatic environments exposed to a large variety of chemical contaminants and to improve early warning biological water quality monitoring tools, capable of detecting sublethal effects on biological communities exposed to toxicants. Traditional approaches have mainly focused on the analysis of survival, growth, development and reproductive success in natural populations from polluted habitats (Faria et al., 2008). Such life-cycle endpoints are also widely used in laboratory investigations with model organisms, for examining the effects of particular toxicants (León et al., 2008). Interesting data are obtained from these studies, but they fail to provide information on the more subtle effects of chemicals on organisms. Hazardous substances can have detrimental effects on aquatic biota at the molecular and cellular levels, later shown at both organismal and population levels. Novel approaches based on suborganismal parameters are providing valuable information about the molecular underpinnings of certain phenomena, such as acute response to toxicants and adaptation to chronic exposure to polluted environments. Moreover, molecular endpoints reveal specific cellular targets of toxicants, highlighting the underlying mechanisms of their mode of action. Biochemical biomarkers, such as enzyme activities (e.g., cholinesterase, glutathione *S*-transferase, among others), have been shown to be useful toxicity tools for the assessment of environmental toxicants (Jemec et al., 2010; Damasio et al., 2010). Recently, the identification and validation of marker genes is gaining acceptance in aquatic toxicology, because these genes can provide a rapid, sensitive, and high throughput assay for testing compounds (Steinberg et al., 2008). Advances in ecotoxicogenomics are being made especially in fish species (Costa et al., 2011), but due to the lack of genomic information there are still few studies in aquatic invertebrates, even though they are predominant in aquatic communities. Moreover, there have been even fewer studies in natural populations collected in the field. This adds to the interest of the present work, as its main focus was to test ecotoxicity biomarkers in natural environments, so as to

evaluate if such biomarkers could be used as monitoring tools for assessing the health status of organisms exposed to complex mixtures of pollutants. The biomarkers tested included different gene markers previously used in controlled scenarios, such as laboratory assays.

Aquatic larvae of the midge *Chironomus riparius* (Meigen) have been selected as test organisms to investigate the effects of aquatic sediment-associated contaminants (EPA, 1996; OECD, 2001). Sediments are the sink for contaminants and can serve as a reservoir of toxic compounds that continually threaten the health and viability of aquatic biota. Communities of benthic organisms play a key role in energy, nutrient and contaminant fluxes to higher trophic levels. Therefore, the consequences of exposure to toxic substances on benthic organisms should be studied more closely under realistic scenarios. Bioassays based on *Chironomus* life-cycle parameters, using survival, growth, and development as endpoints, have been employed to assess water quality and contamination in rivers (Faria et al., 2006). Certain cytogenetic effects induced by environmental factors have also been analyzed (Michailova et al., 2006; Planelló et al., 2007). However, to date, analysis of molecular biomarkers in field populations has been limited to a few enzymatic activities (Olsen et al., 2001) and to semiquantitative analysis of membrane multixenobiotic transporters (Moreau et al., 2008; Saez et al., 2008). Recent research in gene expression profiles in this species is adding new endpoints that are now being used in laboratory studies to evaluate the short time effects of specific toxicants (Lee et al., 2006; Park and Kwak, 2008, 2012; Planelló et al., 2008; Morales et al., 2011; Nair et al., 2011; Martínez-Guitarte et al., 2012; Martínez-Paz et al., 2012; Park et al., 2012). Nevertheless, none of the marker genes identified have yet been tested in wildlife populations of *Chironomus*. Standard ecotoxicological tests often cannot handle the complexity of life in nature, and a mismatch between laboratory and field conditions can lead to errors in ecological risk assessment (Laskowsky et al., 2010).

In the present work, a comparative analysis a battery of biomarkers was carried out in natural populations sampled in three different polluted rivers in Galicia (Spain). Physical and chemical characteristics of the sediments were measured at each sampling site. Different biomarkers were selected for this study: the *hsp70* and *hsc70* genes related to the stress response in cells; the ecdysone receptor gene (*EcR*) related to hormonal signaling; the cytochrome *P450* gene (*CYP4G*) and the glutathione *S*-transferase enzymatic activity related to detoxification pathways; the RNA:DNA ratio, total



## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 3

protein and glycogen content related to growth and metabolic rates; and, finally, the mouthpart deformities related to sublethal effects during larval development. The data obtained in field populations from polluted environments may allow the characterization of sensitive and stable biomarkers, which will assist in improving the definition of the complex scenario that involves adaptation to chronic exposure to xenobiotics of native benthic invertebrate communities.

## MATERIALS AND METHODS

### Test Animals and Culture Conditions

The experimental animals were the aquatic larvae from the midge *Chironomus riparius*. Field populations were collected in the rivers Con, Sar, and Louro, located in Galicia (Spain) as described below. Fourth instar larvae were collected in October 2010 from one selected area around 50–100 m<sup>2</sup> in each river, with at least four sampling sites in the prospective area. Sampling was performed choosing the most suitable microhabitats for these organisms, that is, places with a very low current velocity, fine sediment and accumulated organic matter. Harvesting was carried out with a small hand net of 15 cm diameter, 20 cm deep, and a mesh size of 250 µm. Larvae were weighed and stored frozen at –80°C until used. Because of the difficulty in finding *C. riparius* in non contaminated areas in the upper course of the rivers, laboratory cultures were used as reference for populations never exposed to toxicants. Larvae used as unexposed controls were obtained from a permanent laboratory culture reared under standard laboratory conditions for several years according to toxicity testing guidelines (EPA, 1996; OECD, 2001). Laboratory larvae were grown in culture medium (0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.025 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mM FeCl<sub>3</sub>) supplemented with nettle leaves, commercial fish food, and cellulose tissue, maintained at 20°C under constant aeration and standard light-dark periods 16:8.

### Study Sites

The rivers Con, Sar, and Louro are located in Galicia (north-west Spain). The river Con is a small coastal river (about 10 km in length) that receives the domestic and agricultural effluents of a small rural area, notably pesticides used in potato and corn crops and in vineyards. The sampling site (UTM: 29T 520043E 475571N) was about 1 km from the river mouth. The river Sar receives the effluents of the wastewater treatment plant of Santiago de Compostela (a city with a population of around 100,000 inhabitants), and is considered to be one of the most polluted rivers in Galicia (Prego et al., 2008). The sampling site (UTM: 29T 528728E 4744922N) is located about 4 km downstream of the plant. The river Louro is the most polluted tributary of the river

Miño, as it receives untreated or insufficiently treated industrial and municipal wastewaters from the industrial area of Porriño and the city of Tui in Spain. The sampling area (UTM: 29T 530009E 4657720N) presents high levels of organic matter and pesticides (UN Economic and Social Council, 2007).

For each river and condition at least four sampling sites were established within the prospective area and many larvae were collected. Because HSP70 is known to respond to all sorts of stressors, to avoid the stress of larvae until being processed in the laboratory (at the *Encoro do Con Hydrobiological Field Station*, Pontevedra) they were stored into ten-liter containers with water and sediment of the sampling point and transported into polystyrene cubes at a constant low temperature (15°C). Routes did not last more than 30 min in any case. After confirmation of the developmental stage, larvae were frozen at –80°C in dry ice. Sediment samples were taken just after larvae sampling from each of the selected sites within the prospected area from the different rivers. Sediment samples from each river were transported as mentioned above and mixed in the laboratory for further chemical analysis.

Sediment analyses were performed by the Analytical Department of the University of Coruña. The analysis of pesticides was carried out by liquid–liquid extraction, using liquid–solid chromatography for purification of extracts and GC-MS (Thermo Finnigan Polaris Q) for detection. The analytical procedure was validated using the certified reference material NIST 1944 ( $n = 6$ ) and sediments spiked with known concentration of target analytes (10 and 50 µg kg<sup>–1</sup>,  $n = 6$ ). The quantitation limit was fixed at 0.10 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Recoveries were within 88–103% with relative standard deviations (RSDs) of 12–16%. In each run a blank and a quality control of spiked sediment at 50 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte were determined. Blank samples were below the method quantitation limit for all compounds, and recoveries were within the quality control acceptance criteria (80–120%). Environmental concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the sediments were analyzed by HPLC/MS (Applied Biosystem API 3200 and Thermo LTQ Orbitrap) after ultrasonic solvent extraction. The method was validated by fortifying sediments at 10, 20, and 100 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte ( $n = 6$ ). The quantitation limit was fixed at 0.10 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Recoveries were within 82–110% with RSDs of 18–21%. In each run a blank was measured, as well as spiked sediment at 50 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Blank samples were below the method quantitation limit for all compounds, and recoveries were within the quality control acceptance criteria (80–120%). Temperature, pH, conductivity and TDS were measured in the field with a multisensor (Crison MM-40) directly at the sampling sites, and the data are shown in Table I. Dissolved oxygen (DO) was measured with an oximeter (YSI 550A). The content of organic matter in sediment was calculated by the loss of weight of samples after calcination for 4 h at 450°C.

T1

## 2 PLANELLÓ ET AL.

endpoints, including gene expression, as suitable tools that, complementing other ecotoxicological parameters, may help to improve the methodologies of freshwater monitoring under the increasing burden of xenobiotics. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol 00: 000–000, 2013.

**Keywords:** Hsp70; Hsc70; EcR; Cyp450; GST; glycogen; mentum deformities; biomarkers; environmental monitoring; ecotoxicology

## INTRODUCTION

The potentially adverse effects on wildlife of the increasing number of anthropogenic chemicals released into the environment have become a serious issue. In addition to concerns about exposure to individual substances, there is growing awareness about the importance of mixtures of several chemicals, as actually found in polluted freshwaters. One of the challenges facing environmental toxicologists is to understand the biological responses of organisms living in natural aquatic environments exposed to a large variety of chemical contaminants and to improve early warning biological water quality monitoring tools, capable of detecting sublethal effects on biological communities exposed to toxicants. Traditional approaches have mainly focused on the analysis of survival, growth, development and reproductive success in natural populations from polluted habitats (Faria et al., 2008). Such life-cycle endpoints are also widely used in laboratory investigations with model organisms, for examining the effects of particular toxicants (León et al., 2008). Interesting data are obtained from these studies, but they fail to provide information on the more subtle effects of chemicals on organisms. Hazardous substances can have detrimental effects on aquatic biota at the molecular and cellular levels, later shown at both organismal and population levels. Novel approaches based on suborganismal parameters are providing valuable information about the molecular underpinnings of certain phenomena, such as acute response to toxicants and adaptation to chronic exposure to polluted environments. Moreover, molecular endpoints reveal specific cellular targets of toxicants, highlighting the underlying mechanisms of their mode of action. Biochemical biomarkers, such as enzyme activities (e.g., cholinesterase, glutathione *S*-transferase, among others), have been shown to be useful toxicity tools for the assessment of environmental toxicants (Jemec et al., 2010; Damasio et al., 2010). Recently, the identification and validation of marker genes is gaining acceptance in aquatic toxicology, because these genes can provide a rapid, sensitive, and high throughput assay for testing compounds (Steinberg et al., 2008). Advances in ecotoxicogenomics are being made especially in fish species (Costa et al., 2011), but due to the lack of genomic information there are still few studies in aquatic invertebrates, even though they are predominant in aquatic communities. Moreover, there have been even fewer studies in natural populations collected in the field. This adds to the interest of the present work, as its main focus was to test ecotoxicity biomarkers in natural environments, so as to

evaluate if such biomarkers could be used as monitoring tools for assessing the health status of organisms exposed to complex mixtures of pollutants. The biomarkers tested included different gene markers previously used in controlled scenarios, such as laboratory assays.

Aquatic larvae of the midge *Chironomus riparius* (Meigen) have been selected as test organisms to investigate the effects of aquatic sediment-associated contaminants (EPA, 1996; OECD, 2001). Sediments are the sink for contaminants and can serve as a reservoir of toxic compounds that continually threaten the health and viability of aquatic biota. Communities of benthic organisms play a key role in energy, nutrient and contaminant fluxes to higher trophic levels. Therefore, the consequences of exposure to toxic substances on benthic organisms should be studied more closely under realistic scenarios. Bioassays based on *Chironomus* life-cycle parameters, using survival, growth, and development as endpoints, have been employed to assess water quality and contamination in rivers (Faria et al., 2006). Certain cytogenetic effects induced by environmental factors have also been analyzed (Michailova et al., 2006; Planelló et al., 2007). However, to date, analysis of molecular biomarkers in field populations has been limited to a few enzymatic activities (Olsen et al., 2001) and to semiquantitative analysis of membrane multixenobiotic transporters (Moreau et al., 2008; Saez et al., 2008). Recent research in gene expression profiles in this species is adding new endpoints that are now being used in laboratory studies to evaluate the short time effects of specific toxicants (Lee et al., 2006; Park and Kwak, 2008, 2012; Planelló et al., 2008; Morales et al., 2011; Nair et al., 2011; Martínez-Guitarte et al., 2012; Martínez-Paz et al., 2012; Park et al., 2012). Nevertheless, none of the marker genes identified have yet been tested in wildlife populations of *Chironomus*. Standard ecotoxicological tests often cannot handle the complexity of life in nature, and a mismatch between laboratory and field conditions can lead to errors in ecological risk assessment (Laskowsky et al., 2010).

In the present work, a comparative analysis a battery of biomarkers was carried out in natural populations sampled in three different polluted rivers in Galicia (Spain). Physical and chemical characteristics of the sediments were measured at each sampling site. Different biomarkers were selected for this study: the *hsp70* and *hsc70* genes related to the stress response in cells; the ecdysone receptor gene (*EcR*) related to hormonal signaling; the cytochrome *P450* gene (*CYP4G*) and the glutathione *S*-transferase enzymatic activity related to detoxification pathways; the RNA:DNA ratio, total

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 3

protein and glycogen content related to growth and metabolic rates; and, finally, the mouthpart deformities related to sublethal effects during larval development. The data obtained in field populations from polluted environments may allow the characterization of sensitive and stable biomarkers, which will assist in improving the definition of the complex scenario that involves adaptation to chronic exposure to xenobiotics of native benthic invertebrate communities.

## MATERIALS AND METHODS

### Test Animals and Culture Conditions

The experimental animals were the aquatic larvae from the midge *Chironomus riparius*. Field populations were collected in the rivers Con, Sar, and Louro, located in Galicia (Spain) as described below. Fourth instar larvae were collected in October 2010 from one selected area around 50–100 m<sup>2</sup> in each river, with at least four sampling sites in the prospective area. Sampling was performed choosing the most suitable microhabitats for these organisms, that is, places with a very low current velocity, fine sediment and accumulated organic matter. Harvesting was carried out with a small hand net of 15 cm diameter, 20 cm deep, and a mesh size of 250 µm. Larvae were weighed and stored frozen at –80°C until used. Because of the difficulty in finding *C. riparius* in non contaminated areas in the upper course of the rivers, laboratory cultures were used as reference for populations never exposed to toxicants. Larvae used as unexposed controls were obtained from a permanent laboratory culture reared under standard laboratory conditions for several years according to toxicity testing guidelines (EPA, 1996; OECD, 2001). Laboratory larvae were grown in culture medium (0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.025 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mM FeCl<sub>3</sub>) supplemented with nettle leaves, commercial fish food, and cellulose tissue, maintained at 20°C under constant aeration and standard light-dark periods 16:8.

### Study Sites

The rivers Con, Sar, and Louro are located in Galicia (north-west Spain). The river Con is a small coastal river (about 10 km in length) that receives the domestic and agricultural effluents of a small rural area, notably pesticides used in potato and corn crops and in vineyards. The sampling site (UTM: 29T 520043E 475571N) was about 1 km from the river mouth. The river Sar receives the effluents of the wastewater treatment plant of Santiago de Compostela (a city with a population of around 100,000 inhabitants), and is considered to be one of the most polluted rivers in Galicia (Prego et al., 2008). The sampling site (UTM: 29T 528728E 4744922N) is located about 4 km downstream of the plant. The river Louro is the most polluted tributary of the river

Miño, as it receives untreated or insufficiently treated industrial and municipal wastewaters from the industrial area of Porriño and the city of Tui in Spain. The sampling area (UTM: 29T 530009E 4657720N) presents high levels of organic matter and pesticides (UN Economic and Social Council, 2007).

For each river and condition at least four sampling sites were established within the prospective area and many larvae were collected. Because HSP70 is known to respond to all sorts of stressors, to avoid the stress of larvae until being processed in the laboratory (at the *Encoro do Con Hydrobiological Field Station*, Pontevedra) they were stored into ten-liter containers with water and sediment of the sampling point and transported into polystyrene cubes at a constant low temperature (15°C). Routes did not last more than 30 min in any case. After confirmation of the developmental stage, larvae were frozen at –80°C in dry ice. Sediment samples were taken just after larvae sampling from each of the selected sites within the prospected area from the different rivers. Sediment samples from each river were transported as mentioned above and mixed in the laboratory for further chemical analysis.

Sediment analyses were performed by the Analytical Department of the University of Coruña. The analysis of pesticides was carried out by liquid–liquid extraction, using liquid–solid chromatography for purification of extracts and GC-MS (Thermo Finnigan Polaris Q) for detection. The analytical procedure was validated using the certified reference material NIST 1944 ( $n = 6$ ) and sediments spiked with known concentration of target analytes (10 and 50 µg kg<sup>–1</sup>,  $n = 6$ ). The quantitation limit was fixed at 0.10 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Recoveries were within 88–103% with relative standard deviations (RSDs) of 12–16%. In each run a blank and a quality control of spiked sediment at 50 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte were determined. Blank samples were below the method quantitation limit for all compounds, and recoveries were within the quality control acceptance criteria (80–120%). Environmental concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the sediments were analyzed by HPLC/MS (Applied Biosystem API 3200 and Thermo LTQ Orbitrap) after ultrasonic solvent extraction. The method was validated by fortifying sediments at 10, 20, and 100 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte ( $n = 6$ ). The quantitation limit was fixed at 0.10 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Recoveries were within 82–110% with RSDs of 18–21%. In each run a blank was measured, as well as spiked sediment at 50 µg kg<sup>–1</sup> for each analyte. Blank samples were below the method quantitation limit for all compounds, and recoveries were within the quality control acceptance criteria (80–120%). Temperature, pH, conductivity and TDS were measured in the field with a multisensor (Crison MM-40) directly at the sampling sites, and the data are shown in Table I. Dissolved oxygen (DO) was measured with an oximeter (YSI 550A). The content of organic matter in sediment was calculated by the loss of weight of samples after calcination for 4 h at 450°C.

T1

## 4 PLANELLÓ ET AL.

**TABLE I. Physicochemical parameters measured at the sampling sites in the Con, Sar, and Louro rivers and in laboratory cultures**

Sites	<i>T</i> (°C)	pH	Dissolved Oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	Oxygen Saturation (%)	Conductivity <sup>a</sup> (μS cm <sup>-1</sup> )	TDS <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Organic Matter (%)
Lab	20	7.7	7.75	84.7	530	339	–
Con	15.8	6.5	9.33	94.3	136	87.3	1.43
Sar	16.4	6.8	6.16	84.1	228 <sup>b</sup>	145.8	2.3
Louro	16.2	6.3	7.42	75.4	121.5	77.8	1.85

<sup>a</sup>Conductivity in noncalcareous unpolluted Galician rivers ranges from about 40–100 μS cm<sup>-1</sup> (Membiela et al., 1991).<sup>b</sup>TDS: Total dissolved solids.**RNA Extraction**

RNA was extracted from a total of 20 frozen larvae for each population, divided into groups of five, using a guanidine isothiocyanate based method, performed with a commercial kit (TRIzol, Invitrogen). Briefly, frozen material was homogenized in one volume of TRIzol and left for 5 min at room temperature. Then, 0.2 volumes of chloroform were added to each sample, mixed and left for 5 min at room temperature. Subsequently, the samples were centrifuged for 15 min at 4°C and 15000g. Following transfer of the aqueous phase, the RNA was finally recovered by isopropyl alcohol precipitation (0.5v/v), washed with 70% ethanol, and resuspended in DEPC water. The RNA was then treated with RNase-free DNase (Roche). The quality and quantity of total RNA were determined by agarose electrophoresis and absorbance spectrophotometry (Nanodrop1000, Thermo), and the purified RNA was finally stored at –80°C.

**DNA Extraction**

After complete removal of the aqueous phase, as described in the RNA isolation protocol, the DNA in the interphase and phenol phase from the initial homogenate was isolated according to the manufacturer's protocol. Following precipitation in 100% ethanol, the DNA pellet was washed twice in

a solution containing 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, once with 70% ethanol and, finally, resuspended in water. The DNA was then treated with DNase-free RNase (Roche). The use of TRIzol® Reagent (Invitrogen) allowed the extraction of RNA and DNA content from the same samples. Simultaneous extraction of genomic DNA and RNA was used for calculating the RNA:DNA ratio.

**Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

RT-PCR was used to evaluate the mRNA expression profiles of the different selected genes in larvae sampled in laboratory and wildlife populations from the three selected rivers. Reverse transcription was performed with 1 μg of the isolated RNA. An oligo dT primer (Invitrogen) was used with the M-MLV enzyme (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The cDNAs obtained were stored at –20°C until being used as templates for PCR reactions. Amplification reactions were carried out using gene-specific primers, with GAPDH and 26s as reference genes (Martínez-Paz et al., 2012). The *EcR*, *hsp70*, *hsc70*, and *CYP4G* gene primers are described in Planelló et al. (2008); Morales et al. (2011) and Martínez-Paz et al. (2012). Sequences and fragment size of each gene-specific pair of primers are shown in Table II. *Chironomus riparius* gene

T2

**TABLE II. Primers used for semiquantitative RT-PCR of genes studied from *C. riparius***

Gene	Primer	Fragment Size
EcR forward	5' - AGACGGTTATGAACAGCC - 3'	240 bp
EcR reverse	5' - CGAGCCATGCGCAACATC - 3'	
CYP4G forward	5' - GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG - 3'	340 bp
CYP4G reverse	5' -TAAGTGGAACTGGTGGGTACAT - 3'	
Hsp70 forward	5' - CATGTGAACGAGCCAAGAGA - 3'	274 bp
Hsp70 reverse	5' - TTGCCACAGAAGAAATCTTG - 3'	
Hsc70 forward	5' - CGTGCTATGACTAAGGACAA - 3'	239 bp
Hsc70 reverse	5' - GCTTCATTGACCATACGTTT - 3'	
GAPDH forward	5' - TCATCAAAGCCGTTGTCT - 3'	243 bp
GAPDH reverse	5' - AATCGAATTGCAACACC - 3'	
26S forward	5' - TTCGCGACCTCAACTCATGT - 3'	220 bp
26S reverse	5' - CCGCATTCAGCTGGACTTA - 3'	

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 5

fragments were cloned and sequenced to ensure that they matched the selected genes. PCR was performed in 20 µL with 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Biotools, Spain), 0.4 µM of each primer and 0.2 µL of Taq polymerase (Biotools, Spain) under the following conditions: denaturation for 30 s, annealing for 30 s and elongation for 40 s. A MiniOpticon Thermocycler (Bio-Rad) was used. After several trials to ensure log-phase amplification, 24 and 30 cycles were carried out depending on the gene, with an annealing temperature of 55°C to amplify the fragments corresponding to EcR, hsp70, hsc70, 26s, GAPDH, and CYP4G. The amplified PCR products were run through a 9% acrylamide gel at 60 V for 3 h in 1x TGE buffer (40 mM Tris-Cl (pH 8.5), 200 mM glycine, and 2.5 mM EDTA), visualized after ethidium bromide staining and quantified with Chemigenius3 (Syngene), using GeneSnap 6.05 and GeneTools 3.06 software. Values of density across the whole bands were normalized against the median values of GAPDH and 26 s standards, and the relative expression levels were then calculated. A total of 20 larvae for each population were used for gene expression analysis, divided into four groups (five larvae each) to minimize intrinsic differences to the larvae being sampled. To avoid variations caused by experimental procedures each group was analyzed four times (four replicates).

### Protein Extraction

Frozen larvae were homogenized in 0.5 mL of Tris-EDTA buffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.8) with 7x complete EDTA-Free protease inhibitor (Roche), with a pellet mixer (VWR). Crude homogenate was then centrifuged for 15 min at 500 rpm at 4°C. Subsequently, the supernatant was centrifuged for 30 min at 10,000 rpm at 4°C. Total protein was quantified with BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) and 25 µg of total protein was used for the enzymatic assay.

### Glutathione S-Transferase (GST) Activity

To evaluate GST activity, protein extraction from 20 larvae was performed as described above. Total protein was quantified with BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) and 25 µg of total protein were used for the enzymatic assay. The GST activity was assessed spectrophotometrically with the kit GST (Sigma) in a Jasco V-530 spectrophotometer. This kit uses 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which is suitable for the broadest range of GST isozymes. Conjugation of the thiol group of the glutathione to the CDNB substrate produces an increase of absorbance at 340 nm. The change in absorbance at 340 nm is used to calculate GST activity.

### Estimation of Glycogen

Glycogen was extracted by the boiling alkali method determined by the anthrone method as described in Servia et al.

(2006). Glycogen was determined spectrophotometrically at 620 nm (UV-Visible spectrophotometer, UVI-1002E model, Thermo Electron Corporation, England) using type VIII glycogen from *Crepidula fornicata* (Sigma) as the standard.

### Evaluation of Mouthpart Deformities

To remove excess soft tissue, the head capsules of each sample (Con: 182; Sar: 174; Louro: 152; Laboratory: 152) was removed from the bodies and cleaned for 2 h in 10% KOH at 50°C. These capsules were subsequently mounted on microscope slides using glycerin gel mounting medium (gelatine powder 10 g, glycerol 54 mL, distilled water 60 mL, crystal phenol 0.5 g). Mentum deformities were identified by the criteria used by Servia et al. (2000). A split or bifid central tooth of the mentum was not recorded as a deformity, because this characteristic has generated considerable controversy among researchers regarding its origin, which may not be related to pollutants (Servia et al., 2002 and references therein).

### Statistical Analysis

Normality and homoscedasticity of data were tested using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The normalized levels of the specific gene transcripts, GST enzyme activity, the RNA:DNA ratio, and protein and glycogen content were analyzed with ANOVA, followed by Games Howell's or Tukey's post Hoc tests, using SPSS 19 (IBM), when appropriate. Additionally, ANOVA residuals were also tested for normality and homoscedasticity. If data were not homogeneous or normally distributed the Kruskal-Wallis test was used, and the differences between pairs were analyzed with Mann-Whitney U tests. Probabilities were corrected using the Bonferroni correction. The frequency of deformed individuals was compared by a Chi-square test. The differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

To study the eventual relationship among contaminants and biomarkers, a multidimensional scaling (MDS) analysis was used. MDS allows displaying the structure of distance-like data as a geometrical picture (Kotz et al., 1985). Each object (variable) is represented by a point in a multidimensional (two-dimensional in our case) space. The points are arranged in this space, so that the distances between pairs of points have the strongest possible relation to the similarities among the pairs of objects. That is, two similar objects are represented by two points that are close together, and two dissimilar objects are represented by two points that are far apart. The Euclidean distance has been used as a measure of dissimilarity between variables. This procedure is free of the distributional problems of the variables. To avoid problems due to the scale of measurement of the different variables, the standardized values were used.

## 6 PLANELLÓ ET AL.

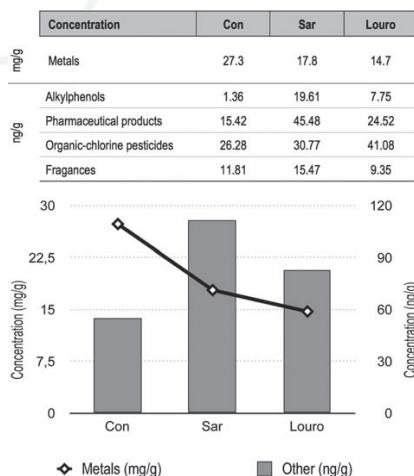
**TABLE III. Organochlorine pesticides, alkylphenols, pharmaceutical products, fragrances, and metals measured in sediments collected at the three investigated rivers**

Organochlorine Pesticides (ng g <sup>-1</sup> )	Con	Sar	Louro	Pharmaceutical Products (ng g <sup>-1</sup> )	Con	Sar	Louro
a-HCH	<0.10	0.13	1.26	Ibuprofen	3.73	25.62	14.41
b-HCH	<0.10	<0.10	0.32	Diclofenac	1.06	0.85	0.86
g-HCH	<0.10	0.12	<0.10	Carbamazepine	<0.10	<0.10	0.23
d-HCH	0.36	<0.10	1.85	Atenolol	9.84	18.07	8.36
Heptachlor	0.1	0.26	0.11	Caffeine	0.62	0.94	0.65
Aldrin	0.16	0.2	<0.10	Enrofloxacin	0.17	<0.10	<0.10
Heptachlor epoxide	<0.10	<0.10	<0.10	<b>Fragrances (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Con</b>	<b>Sar</b>	<b>Louro</b>
g-Chlordane	0.17	0.1	0.37	Galaxolide	5.53	7.90	3.02
a-Chlordane	0.12	<0.10	0.37	Tonalide	6.28	7.57	6.33
a-Endosulfan	0.83	0.72	<0.10	<b>Metals (μg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Con</b>	<b>Sar</b>	<b>Louro</b>
p,p'-DDE	0.2	0.3	0.76	Cd	<0.10	<0.10	<0.10
Dieldrin	<0.10	<0.10	<0.10	Pb	8.28	11.52	5.96
Endrin	<0.10	0.64	1.18	Cr	4.15	19.83	5.02
b-Endosulfan	6.27	19.28	18.25	Ni	3.62	10.50	2.99
p,p'-DDD	1.1	0.27	1.7	Cu	5.81	20.37	3.13
Endrin aldehyde	2.28	3.29	<0.10	As	4.24	2.35	3.01
Endosulfan sulfate	4.28	0.62	4.13	Hg	<0.05	0.05	<0.05
p,p'-DDT	4.01	1.93	3.21	Mn	210.00	96.31	128.46
Endrin ketone	4.19	0.92	6.41	Zn	56.14	84.86	31.47
Methoxychlor	2.21	1.99	1.16				
<b>Alkylphenols (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Con</b>	<b>Sar</b>	<b>Louro</b>	<b>Metals (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Con</b>	<b>Sar</b>	<b>Louro</b>
Bisphenol A	0.77	18.84	7.44	Al	9.90	8.34	6.47
Nonilphenol	0.58	0.77	0.31	Fe	17.14	9.19	8.03

## RESULTS

## Chemical Analysis of Sediments

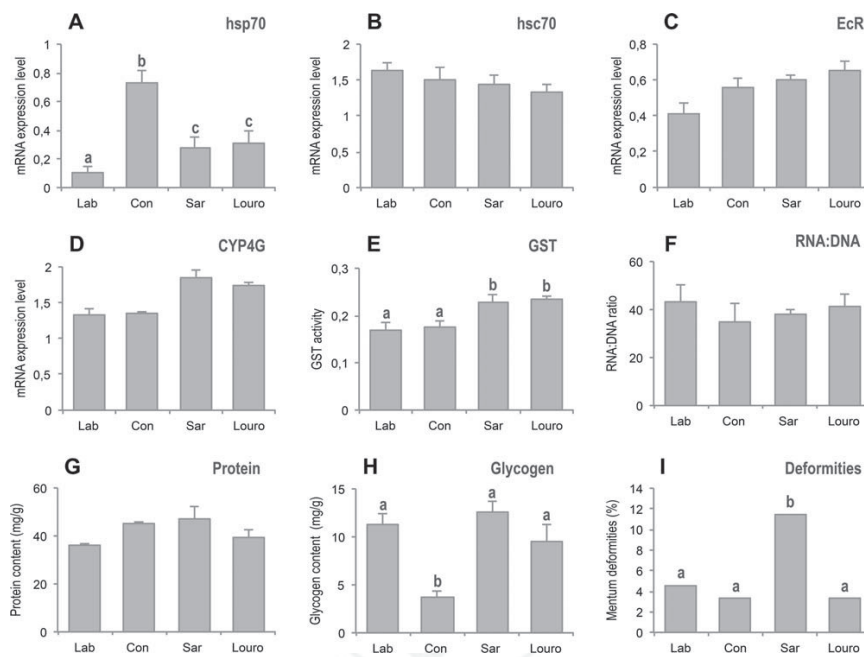
To quantify the levels of known toxicants, targeted chemical analysis of the sediments in each sampling site was performed from samples of sediments collected simultaneously with the larvae in the rivers Con, Sar, and Louro. As shown in Table III, all the eleven investigated metals were found in the three rivers sampled and, although the river Sar showed high levels of Cr, Ni, and Cu, the total metal content was higher in the sediments of the river Con, mainly due to the presence of high levels of Mn, As and Fe. All 20 organic-chlorine pesticides (OCPs) investigated were present in the three rivers, in particular beta-endosulfan, endosulfan sulfate, endrin ketone, 4,4'-DDD, methoxychlor and 4,4'-DDT (Table III). The river Louro presented the highest total content of OCPs. Alkylphenols and pharmaceutical and personal care products (PPCPs) were the other toxic compounds analyzed, and the results are shown in Table III. For both alkylphenols and PPCPs, the highest levels for total content were reached in the river Sar. This may well be due to the presence of the hospital and the wastewater treatment plant of Santiago de Compostela, which are located upstream of our sampling site. Figure 1 summarizes the differences found in the total content of metals and organic compounds in the sediments of the three rivers analyzed.



**Fig. 1.** Total content of metals and organic compounds (organic-chlorine pesticides, alkylphenols, pharmaceutical and personal care products) in sediment samples from the rivers Con, Sar, and Louro.



## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 7



**Fig. 2.** Expression levels of the *hsp70* gene (A), *hsc70* gene (B), *EcR* gene (C), and *CYP4G* gene (D) in *C. riparius* larvae from laboratory cultures (Lab) and wildlife populations sampled in the rivers Con, Sar, and Louro. The mRNA densitometric values were calculated relative to GAPDH and 26s as reference genes. Analysis of glutathione S-transferase activity (E), RNA: DNA ratio total (F), protein content (G) and total glycogen content (H), measured in laboratory populations and *C. riparius* larvae from laboratory cultures and field populations sampled in the rivers Con, Sar, and Louro. Each bar is the mean  $\pm$  SE. For each location and method 20 larvae were used, separated into groups of five, and four experimental replicates were made for each group. (I) Percentage of mouthpart deformities in *C. riparius* fourth instar larvae from laboratory cultures ( $n = 152$ ) and wildlife populations sampled in the rivers Con ( $n = 182$ ), Sar ( $n = 174$ ), and Louro ( $n = 152$ ). Different letters indicate significant differences across groups ( $P \leq 0.05$ ).

### Stress Response: Analysis of the Expression Levels of the 70-kD Heat-Shock Gene Family

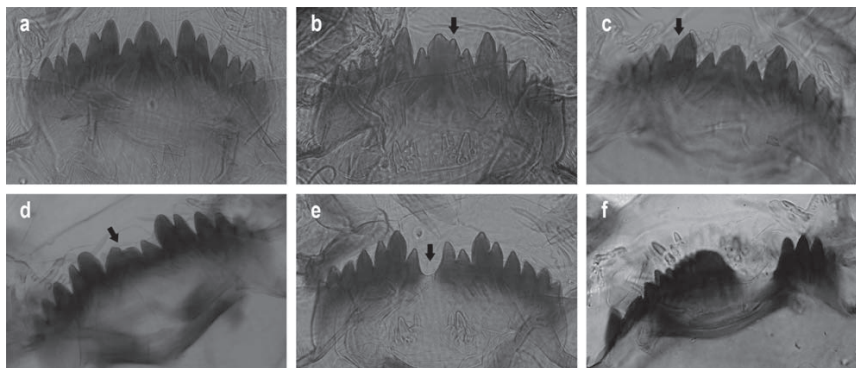
The expression of the *hsp70* and *hsc70* genes encoding for these proteins was measured by the levels of their respective mRNA using RT-PCR. As shown in Figure 2(A), a significantly higher expression of the *hsp70* gene was found in field larvae collected in the three rivers in comparison with that for larvae reared under laboratory conditions and not exposed to toxicants. Significant differences were also found among the populations from the different rivers analyzed, with the highest levels of *hsp70* in larvae sampled from the

river Con, which had the highest content of metals measured in sediments (Fig. 1). In contrast, analysis of the expression of the constitutive *hsc70* gene did not show any differences, with similar *hsc70* mRNA levels in both field and laboratory samples [Fig. 2(B)].

### Ecdysone-Mediated Pathway: Expression Profiles of the Ecdysone Receptor Gene

The *EcR* gene was selected as an endocrine-related biomarker and RT-PCR analysis was used to evaluate transcript levels with specific primers. As shown in Figure 2(C), no

## 8 PLANELLÓ ET AL.



**Fig. 3.** Normal and deformed mentum of *Chironomus riparius*. (A) Normal mentum. (B) Extra tooth. (C) Missing tooth. (D) Fused teeth. (E) Köhn gap. (F) Massive deformities.

statistically significant differences were found, although a trend of increasing levels of EcR in field populations from the Con, Sar, and Louro rivers was observed when compared to those reared in the laboratory, with the highest levels found in larvae sampled from the Louro.

#### Detoxification Activities: Cytochrome P450 Gene Expression Levels and GST Enzymatic Activity

*CYP4G* gene expression and glutathione *S*-transferase activity were evaluated as a measurement of detoxification activity in the different *Chironomus riparius* populations. *CYP* genes coding for cytochrome P450, a superfamily of major phase I detoxification enzymes are xenobiotic-responsive genes. As shown in Figure 2(D), no significant differences were found in *CYP4G* gene expression, although slightly higher activity appeared in populations from the rivers Sar and Louro. Glutathione *S*-transferase (GST), one of the major phase II detoxification enzymes, plays a central role in defense against various environmental toxicants. The results obtained showed a similar trend in both detoxification systems measured using gene and enzyme activities. GST activity was similar in laboratory and river Con larvae [Fig. 2(E)], while the values for GST activity were significantly higher in the populations from the Sar and the Louro [Fig. 2(E)], which had the two highest levels of organic pollutants in sediments.

#### Growth and Metabolic Rates: The RNA:DNA Ratio, Total Protein Content and Glycogen Content

The results showed that there were no significant differences in the RNA:DNA ratio or in total protein content among the

different field populations analyzed, not even between field and laboratory populations [Fig. 2(F,G)]. In contrast, drastic differences were observed for glycogen content among populations; the larvae sampled from the river Con showed a significant reduction in glycogen reserves, when compared with the rest of populations analyzed [Fig. 2(H)].

#### Sublethal Effects During Development: Evaluation of Mouthpart Deformities

Chironomid mouthpart deformities are considered to be useful bioindicators of a variety of pollutants (Martínez et al., 2006; Park and Kwak, 2008). The normal arrangement of teeth in *C. riparius* larvae consists of three median lateral teeth and two sections of lateral teeth. Extra teeth, missing teeth, fused teeth and the presence of Köhn gaps were considered to be mouthpart deformities (Park et al., 2010). Differences in the percentage of total deformities evaluated among sampling sites are presented in Figure 2(1), and illustrated in Figure 3. A significant increase in mouthpart deformities was found in larvae populations sampled from the river Sar, when compared to the rest of samples obtained from laboratory cultures and the Con and Louro rivers.

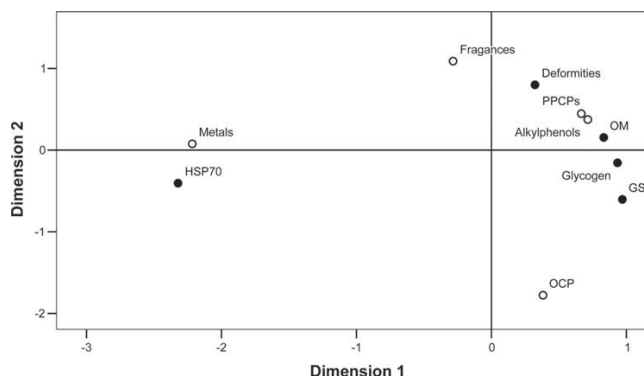
F3

## DISCUSSION

Although the development of biomarkers requires experimental research under laboratory controlled conditions to identify the specific response to particular chemicals or group of compounds, further validation in field populations exposed to complex mixtures of pollutants in their natural habitats is required before making conclusions about their usefulness in realistic field scenarios. The comparative study of a battery of biomarkers revealed remarkable differences



## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 9



**Fig. 4.** Two-dimensional MDS representation of the distance values calculated on contaminants and biomarkers with significant differences between localities. Abbrev.: PPCPs: pharmaceutical products, OM: organic matter; OCP: organic-chlorine products.

when analyzed in natural populations of *Chironomus* larvae collected from different polluted habitats. Most of the biomarkers have been previously tested under experimental exposures to particular toxicants but, to our knowledge, few had been tested to date in field assays. Four out of nine parameters analyzed (*hsp70* gene, GST enzyme, glycogen content and mouthpart deformities) showed significant differences in populations submitted chronically to complex mixtures of toxicants. Other parameters (*hsc70* gene, *EcR* gene, *P450* gene, RNA:DNA ratio, total protein content) appeared to be constant even when comparing field and non-exposed laboratory populations. The rivers differed in the levels and types of contaminants in sediments, although none of the sampling sites showed elevated levels of contamination according to the compounds analyzed in sediments and the freshwater sediment guidelines of MacDonald et al. (2000). Figure 4 summarizes the results of a multivariate analysis combining statistically significant endpoints and groups of contaminants, as well as identifying associations between them. Some potential correlations between sensitive biomarkers and physical or chemical characteristics measured at each site are discussed below. It is worth mentioning the following associations: *hsp70* with metals, mouthpart deformities with PPCPs/alkylphenols, and glycogen content with organic matter. Although this information constitutes a first approach in the search of cause-effect relationships in natural scenarios, more and detailed research is needed to establish clear correlations between exposure to a group of contaminants and differences observed on biomarkers. It is important to bear in mind that, under field conditions, it is difficult to attribute observed changes in the endpoints analyzed to a single group of chemicals, because synergistic and antagonistic interactions may take place, and their inputs

into the natural environment not only encompass their pure state, but also that of other products as a result of degradation (Hassan et al., 2005).

One of the most remarkable differences was found in the *hsp70* gene in the four different *Chironomus riparius* populations analyzed. Heat-shock proteins function to maintain protein integrity, and are commonly considered to be an indicator of cellular stress. The 70-kD heat-shock protein family is an ancient and conserved group of proteins, present in all species and every cell type analyzed to date, which plays a basic role in cells as molecular chaperones. The family includes the cognate proteins (HSC70), highly abundant in normal cellular conditions, as well as inducible members (HSP70) present in stressed conditions provoked by a broad spectrum of physical and chemical insults. A significant overexpression of the *hsp70* gene was observed in the three wildlife populations sampled in the rivers Sar, Con, and Louro, as compared to the laboratory cultures that were never exposed to toxicants. Because temperature is one of the stronger inducers of this gene and HSP70 is known to respond to different stressors, to avoid differences in *hsp70* levels linked to temperature fluctuations, we minimized larvae stress controlling this parameter during their transport to the laboratory. Furthermore, this parameter was similar in the three rivers analyzed (about 16°C) and even higher (20°C) in laboratory cultures. Therefore, high *hsp70* levels were most likely related to the presence of a huge range of organic and metal contaminants in the sediments of the rivers, as shown the strong association between *hsp70* gene activity and metals (Fig. 4), whereas the laboratory cultures were never exposed to toxicants.

It has been previously shown that the *hsp70* gene from *Chironomus* is activated by experimental exposures to

## 10 PLANELLÓ ET AL.

different toxicants (Morales et al., 2011), pesticides (Yoshimi et al., 2002), bisphenol A (Planelló et al., 2008), and phthalates (Park and Kwak, 2008; Planelló et al., 2011). Here we have shown, for the first time, the presence of high levels of *hsp70* gene expression in natural populations collected from aquatic polluted sites, which indicates that the level of expression of *hsp70* could have a relevant protective role in long-term adaptation for survival in chemically adverse environments. Previous studies have reported that organisms living in a thermally polluted habitat experience warm acclimation also resulting in higher levels of *hsp70* expression (Lund et al., 2006). It is interesting to note that the highest levels of *hsp70* were found in larvae sampled from the river Con, which has the highest levels of metals in sediments, especially Fe and Mn. Metals are considered to be potent inducers of heat-shock proteins (Fredj et al., 2010; Guo and Ki, 2012), and exposure to copper, cadmium, lead, and chromium has been shown to activate the *hsp70* gene in *Chironomus* (Karouna-Renier and Zehr, 2003; Lee et al., 2006; Planelló et al., 2010). It would be interesting to analyze the effect of Fe and Mn as inducers of the *hsp70* gene, because to our knowledge there is no information concerning these metals in invertebrates. Currently, the potential use of heat-shock genes and proteins in pollution monitoring is being actively investigated (Gupta et al., 2010). In addition to the growing body of literature that connects the HSP70 protein to different classes of chemical inducers, our results demonstrate that the stress gene *hsp70* could be a sensitive molecular biomarker in wildlife populations permanently exposed to a complex mixture of pollutants. In contrast to the notable differences found in *hsp70*, it is worth pointing out that the expression of the constitutive gene *hsc70* remained constant, suggesting that the *hsc70* seems to be a relatively stable gene in natural populations submitted to the effects of different mixtures of toxicants. The stability of the *hsc70* gene concurs with previous results obtained following experimental exposures to a wide variety of chemicals (Morales et al., 2011). On the basis of our results, it is tempting to propose the ratio of transcripts from both gene members of the 70 kD family (*hsp70/hsc70*) as a consistent indicator for assessing toxicity, when comparing wildlife populations living in polluted environments.

Another interesting result was related to energy reserves. A significant decrease in glycogen content was observed in larvae from the river Con when compared to the rest of the populations analyzed, with a relevant association between glycogen content and organic matter as shown in Figure 4. This data correlates with the highest level of *hsp70* gene expression in the larvae, with the highest content of metals, as well as with the lowest organic matter content in the sediments of that river. These results are in accordance with the assumption that chronic stress causes an energetic cost and, by extension, a decrease in glycogen storage (Bischof, 1995; Choi et al., 2001). One interesting problem in ecotoxicology is the cost of tolerance to toxic chemicals, since presumably

detoxification mechanisms are energy-dependent. Nevertheless, the larvae sampled from the rivers Sar and Louro, also exposed to chemical stressors, did not show significant variations in glycogen reserves; these results concur with those of previous studies in this species, which found no alterations in sugar contents, suggesting that other factors, such as food availability, could compensate for the energy expenditure devoted to counteracting the effects of toxicants (Stuijzand et al., 2000; Servia et al., 2006). In contrast to glycogen content, other metabolic parameters, such as the RNA:DNA ratio and the total protein content, remained constant with similar values for all the field and laboratory populations assayed. The RNA:DNA ratio is considered to be a biochemical indicator of the physiological and nutritional state of aquatic organisms in natural environments, and a useful indicator of anthropogenic impacts in invertebrates and fishes (Okumura et al., 2002; Dahlhoff, 2004; Chicharo and Chicharo, 2008). While DNA content remains constant, RNA concentration, directly related to translation activity, may change depending on age, developmental stage, size, nutritional activity or environmental conditions (Chicharo and Chicharo, 2008). The protein content faithfully reflects the physiological condition of an organism (Villarroel et al., 2009), and glycogen levels are related to energy reserves. The levels of pollution in the rivers studied were probably not sufficiently high to alter these parameters, or to thereby compromise the vitality and survival of the species.

Detoxification systems of organisms play a central role in defense against various environmental toxicants, and can lead organisms to adaptation to chronic exposures in polluted environments. Accordingly, a significantly higher GST activity was detected in larval samples from the rivers Sar and Louro than in the controls. These rivers contained the highest levels of alkylphenols, pharmaceutical products and organochlorine pesticides. GST activity in samples from the river Con, which had the lowest organic pollutant content in sediments, was similar to those of laboratory controls. In insects, increased levels of GST have been associated with organochlorine and organophosphate insecticide resistance (Vontas et al., 2000). We have previously reported that GST levels respond selectively to different xenobiotics. While tributyltin upregulated both the GST enzyme and the *CYP* gene, nonylphenol and bisphenol A exerted the opposite effect in *Chironomus riparius* (Martínez-Paz et al., 2012). P450 cytochromes constitute one of the major phase I-type classes of detoxification enzymes, and glutathione *S*-transferases are major phase II detoxification enzymes. The results of our simultaneous study of these two detoxification systems in field-sampled larvae, suggest a higher detoxification activity, as measured by GST levels, in larvae from rivers with a higher content and variety of organic pollutants (the Sar and Louro rivers).

Morphological mouthpart deformities of *Chironomus* represent sublethal response to pollutants in aquatic ecosystems, and are considered early warning indicators for deterioration

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 11

of water quality (Janssens de Bisthoven and Gerhardt, 2003; Ochieng et al., 2008). Deformities are important morphological endpoints that have been widely used in toxicity studies, and have been suggested as a biomarker for biomonitoring of contamination. In our study, mouthpart deformities were significantly higher in the population of larvae sampled in the river Sar, while larvae from the rivers Con and Louro showed similar levels to the unexposed population. Interestingly, the most notable difference between these three rivers is the presence of higher levels of alkylphenols, particularly bisphenol A, and pharmaceuticals such as ibuprofen and atenolol in the sediments of the river Sar. These results are in accordance with the strong association observed in Figure 4 between deformities, alkylphenols and PPCPs, with minimum Euclidean distances between these variables, as shown in Table IV (Supporting Information). Previous reports have demonstrated a relationship between pollutants and deformities (Hämäläinen, 1999; Di Veroli et al., 2012; Odume et al., 2012) and our results further support the high prevalence of deformities previously found at this site (Servia et al., 2000). Although it is still unknown how pollutants may induce mouthpart deformities, there is an ongoing discussion about whether or not they develop at the endocrine-regulated molting stage, and if a disruption of this process is at the base of their ontogeny (Meregalli and Ollivier, 2001). Some toxic compounds with endocrine disrupting activity have been described as inducers of mouthpart deformities such as 4-nonylphenol, DDT or heavy metals (Meregalli et al., 2001; Martínez et al., 2003).

Finally, no significant differences among populations were found for the ecdysone receptor gene, as an endocrine marker. Although the *EcR* gene appears to be a promising biomarker for testing endocrine disrupting chemicals in insects (Soin and Smagghe, 2007; Planelló et al., 2008, 2010, 2011), further studies are needed to validate this hormonal endpoint in field studies. It is important to point out that natural populations living in polluted environments may be exposed to chemicals that act as hormonal agonists and antagonists, so that compensatory effects could take place with the resulting physiological response being different in complex natural scenarios than in controlled laboratory assays.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that differential patterns in gene expression, enzymatic and metabolic activities and morphological parameters can be detected in natural populations of *Chironomus riparius* submitted to chronic exposure to toxicants in their natural habitats, with notable specificities depending on the toxicological characteristics of the sediments. The results suggest new sensitive endpoints, including genes, as potential biomarkers in field studies that, complementing other ecotoxicological parameters, may help to improve the methodologies of freshwater monitoring. Moreover, the changes in specific parameters help to provide a better understanding of the physiological responses in real scenarios, which imply

adaptation by organisms to multiple-stressor environments. Although chemical analysis of the sediments suggested some possible relationships for the observed differences, further research is needed to identify causative relationships between biomarkers and exposure to particular contaminants, as well as the influence of adaptive responses. These data provide the initial insights into the feasibility of using new molecular endpoints to better characterize the metabolic properties of natural populations under environmentally relevant scenarios (low concentrations and chronic exposures, as well as combined exposures to mixtures of toxicants).

The authors thank Dr T. Carretero (University of Zaragoza) and Ted Cater for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Bischof C. 1995. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the hemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 112:87–92.
- Choi J, Roche H, Caquet T. 2001. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera:Chironomidae) larvae. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 130:11–17.
- Chícharo MA, Chícharo L. 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int J Mol Sci* 9: 1453–1471.
- Costa PM, Miguel C, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, DelValls TA, Costa MH. 2011. Transcriptomic analyses in a benthic fish exposed to contaminated estuarine sediments through laboratory and in situ bioassays. *Ecotoxicology* 20:1749–1764.
- Dahlhoff EO. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annu Rev Physiol* 66:183–207.
- Damasio J, Navarro-Ortega A, Tauler R, Lacorte S, Barceló D, Soares AMVM, López MA, Riva MC, Barata C. 2010. Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariable methods. *Ecotoxicology* 19:1084–1094.
- Di Veroli A, Goretti E, Paumen ML, Kraak MHS, Admiral W. 2012. Induction of mouthpart deformities in chironomid larvae exposed to contaminated sediments. *Environ Pollut* 166: 212–217.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1996. Chironomid sediment toxicity test, ecological effects tests guidelines. EPA 712-C-96-313; 2nd ed. 2000 EPA 600/R-99/064, Washington DC, USA.
- Faria MS, Ré A, Malcato J, Silva PCLD, Pestana J, Agra AR, Nogueira AJA, Soares AMVM. 2006. Biological and functional responses of in situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to assess river water quality and contamination. *Sci Total Environ* 37:125–137.
- Faria MS, Lopes RJ, Malcato J, Nogueira AJA, Soares AMVM. 2008. In situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to

## 12 PLANELLÓ ET AL.

- monitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. *Environ Pollut* 151: 213–221.
- Fredj B, Irie M, Han J, Yamada P, Limam A, Ghrabi A, Morio T, Isoda H. 2010. Stress response of heavy metal mixture present in wastewater and leachate on heat-shock protein 47-transfected cells. *Environ Toxicol Chem* 29:1637–1647.
- Gupta SC, Shrama A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sci* 86:377–384.
- Guo R, Ki JS. 2012. Differential transcription of heat shock protein 90 (HSP90) in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* by copper and endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology*.
- Hämäläinen H. 1999. Critical appraisal of the indexes of chironomid larval deformities and their use in bioindication. *Ann Zool Fennici* 36:179–186.
- Hassan R, Schole R, Ash N. 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends*. Washington, DC: Island Press. Volume 1. 917p. Available at: <<http://www.millenniumassessment.org/en/Condition.aspx#download>>.
- Janssens de Bisthoven L, Gerhardt A. 2003. Chironomidae (Diptera, Nematocera) fauna in three small streams of Skania, Sweden. *Environ Monit Assess* 83:89–102.
- Jemec A, Drobne D, Tissler T, Sepic K. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies—Lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res* 17:51171–51181.
- Karouna-Renier NK, Zehr JP. 2003. Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in the midge larvae (*Chironomus tentans*). *Sci Total Environ* 312:267–272.
- Kotz S, Johnson NL, Read CB. 1985. *Lindeberg Conditions to Multitrait-Multimethod Matrices*. Encyclopedia of Statistical Sciences. New York: Wiley-Interscience. Volume 5. 752 p.
- Laskowski R, Bednarska AJ, Kramarz PE, Loureiro S, Scheil V, Kudlek J, Holmstrup M. 2010. Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors—A meta-analysis and case studies. *Sci Total Environ* 408:3763–3774.
- Lee SM, Lee SB, Park CH, Choi J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65:1074–1081.
- León Paumen M, Borgman E, Kraak MHS, Van Gestel CAM, Admiraal W. 2008. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. *Environ Pollut* 152:225–232.
- Lund SG, Ruberté MR, Hofmann GE. 2006. Turning up the heat: The effects of thermal acclimation on the kinetics of hsp70 gene expression in the eurythermal goby *Gillichthys mirabilis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 143:435–446.
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 20–31.
- Martínez EA, Moore BC, Schaumloffel J, Dasgupta N. 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:204–212.
- Martínez EA, Wold L, Moore BC, Schaumloffel J, Dasgupta N. 2006. Morphologic and growth responses in *Chironomus tentans* to arsenic exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 51:529–536.
- Martínez-Guitarte JL, Planelló R, Morcillo G. 2012. Overexpression of long non-coding RNAs following exposure to xenobiotics in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Aquat Toxicol* 110/111:84–90.
- Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2012. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (trybutiltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 155:333–343.
- Membiela P, Montes C, Martínez-Ansemil E. 1991. Características hidroquímicas de Galicia (NW Península Ibérica). *Limnetica* 7:163–174.
- Meregalli G, Ollevier F. 2001. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol: Effects on survival and mouthpart deformities. *Sci Total Environ* 269:157–161.
- Meregalli G, Pluymers L, Ollevier F. 2001. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environ Pollut* 111:241–246.
- Michailova P, Petrova N, Ilkova J, Bovero S, Brunetti S, White K, Sella G. 2006. Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Environ Pollut* 144:647–654.
- Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 153:150–158.
- Moreau X, Saez G, Thiéry A, Clot-Faybesse O, Guiraudie-Capraz G, Bienboire-Frosini C, Martin C, De Jong L. 2008. ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater *Chironomidae* larvae (Diptera): A biomarker calibration step for in situ monitoring of xenobiotic exposure. *Environ Pollut* 153:574–581.
- Nair PM, Park SY, Choi J. 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 154:399–408.
- Ochieng H, de Ruyter van Steveninck ED, Wanda FM. 2008. Mouthpart deformities in *Chironomidae* (Diptera) as indicator of heavy metal pollution in Northern lake Victoria, Uganda. *Afr J Aquat Sci* 33:135–142.
- Odume ON, Muller WJ, Palmer CG, Arimoro FO. 2012. Mentum deformities in *Chironomidae* communities as indicators of anthropogenic impacts in Swartkops River. *Phys Chem Earth* 50-52:140–148.
- OECD. 2001. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for Testing of Chemicals, Sediment-Water

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOMARKERS IN NATURAL POPULATIONS FROM POLLUTED ENVIRONMENTS 13

AQ5

- Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. OECD. p 218.
- Okumura T, Nagasawa T, Hayashi I, Sato S. 2002. Effects of starvation on RNA:DNA ratio, glycogen content, and C:N ratio in columellar muscle of the Japanese turban shell Turbo (Batillus) cornutus (Gastropoda). *Fish Sci* 68:306–312.
- Olsen T, Ellerbeck L, Fisher T, Callaghan A, Crane M. 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environ Toxicol Chem* 220: 1725–1732.
- Park K, Kwak IS. 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74:89–95.
- Park K, Kwak IS. 2012. Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: Effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 156:113–120.
- Park K, Park J, Kim J, Kwak IS. 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4D (2,4-dichlorophen oxyacetic acid). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 151:439–446.
- Park SY, Nair PM, Choi J. 2012. Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 156: 187–194.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2007. Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci Total Environ* 373:113–121.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone-receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71:1870–1876.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci Total Environ* 408:1598–1603.
- Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2011. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquat Toxicol* 105:62–70.
- Prego R, Belzunce MJ, Cobelo A, Helios-Rybicka E. 2008. Particulate metal in the Ulla River estuary: State and sources of contamination (Arosa Ria, NW Iberian Peninsula). *Cienc Mar* 34: 381–388.
- Saez G, De Jong L, Moreau X, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Monod JL, Thiéry A. 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: A step for in situ calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in *Chironomidae* larvae. *Environ Res* 107:51–361.
- Servia MJ, Cobo F, González M. 2000. Seasonal and interannual variations in the frequency and severity of deformities in larvae of *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) and *Procladius olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) collected in a polluted site. *Environ Monit Assess* 64:617–626.
- Servia MJ, Cobo F, González MA. 2002. Monitoring deformities of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae) larvae from first to fourth instar: A potential tool for investigating their origin. *Archiv Hydrobiol* 154:447–460.
- Servia MJ, Péry ARR, Heydorff M, Garric J, Lagadic L. 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15:229–240.
- Soin T, Smaghe G. 2007. Endocrine disruption in aquatic insects: A review. *Ecotoxicology* 16:83–93.
- Steinberg CEW, Stürzenbaum SR, Menzel R. 2008. Genes and the environment. Striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci Total Environ* 400:142–161.
- Stuijzand S, Helms M, Kraak MHS, Admiraal W. 2000. Interacting effects of toxicants and organic matter on the midge *Chironomus riparius* in polluted river water. *Ecotoxicol Environ Saf* 46:351–356.
- Villarreal MJ, Sancho E, Andreu-Moliner E, Ferrando MD. 2009. Biochemical stress response in tetracycline exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction. *Sci Total Environ* 407:5537–5542.
- Vontas JG, Enayati AA, Small GJ, Hemingway J. 2000. A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 68:184–192.
- Yoshimi T, Minowa K, Karouna-Renier NK, Watanabe C, Sugaya Y, Miura T. 2002. Activation of stress-induced gene by insecticides in the midge *Chironomus yoshimatsui*. *J Biochem Mol Toxicol* 16:10–17.











